BIJLAGE I - Analyse

Ctgb Analyse EASAC-rapport en nature publicaties
Het EASAC-rapport beschrijft diverse effecten van neonicotinoiden op organismen en binnen ecosystemen. Het Ctgb heeft de analyse en constateringen van het EASAC-rapport onderverdeeld in:

Alleen referenties van artikelen die niet in het EASAC-rapport worden genoemd, zijn in dit document opgenomen. Voor de overige referenties verwijst het Ctgb naar het EASAC-rapport.

- ***Gedrag van neonicotinoïden in het milieu***

Inhoud van het EASAC-rapport
Het EASAC-rapport bevat met name algemene informatie met betrekking tot het gedrag van neonicotinoïden in het milieu en geen nieuwe data.
De volgende recente (review)artikelen met betrekking op dit beoordelingsgebied zijn opgenomen in het EASAC-rapport:

*Goulson D. (2014). Pesticides linked to bird declines. Nature **511**, 295*
De aangehaalde studie heeft met name betrekking op het risico voor vogels. Er wordt een schematische weergave gegeven van lotgevallen van neonicotinoïden na toepassing: ongeveer 95% komt in bodem en bodemwater en kan zich vanuit daar naar water of niet-doelwitzones verplaatsen. Het artikel bevat geen kwantitatieve gegevens over de grootte van deze stromen.
Verder wordt aangegeven dat neonicotinoïden persistent zijn. Hiervoor wordt o.a. naar een publicatie van Goulson (2013) verwezen. Belangrijke beperkingen zijn dat de daar aangehaalde studies met name eerste tier labexperimenten betroffen, of veldstudies onder onrealistische omstandigheden, en/of studies die niet volgens OECD richtlijnen zijn uitgevoerd.
Voor wat betreft de persistentie van de stoffen in de bodem is de beoordeling door Ctgb in lijn met de Europese toelatingseindpunten (relevante maximale veldhalfwaardetijd in bodem voor Noord-Europa wordt gehanteerd).
In de risicobeoordeling voor bodem wordt de gehele dosering meegenomen in de beoordeling voor zaadbehandelingen, voor spuittoepassingen wordt conform de guidance rekening gehouden met interceptie door het gewas.

De enige concrete verwijzing voor wat betreft gedrag en voorkomen van neonicotinoïden (specifiek imidacloprid) in oppervlaktewater is naar Van Dijk et al (2013). Het Ctgb heeft deze studie al eerder geanalyseerd. Hieruit is niet duidelijk aangetoond dat de gemeten concentraties te relateren zijn aan emissie vanuit zaadbehandelingen. Verder toont de studie slechts correlatieve verbanden aan en geen causaliteit tussen hoge concentraties imidacloprid en effecten . Metingen van concentraties aan imidacloprid en macrofauna-opnamen waren verder niet op dezelfde tijd en plaats uitgevoerd. Deze studie is ook betrokken in de herbeoordeling van het risico voor aquatische organismen van imidacopridhoudende middelen (januari 2014).

*Main, A. et al. (2014). Widespread use and frequent detection of neonicotinoid insecticides in wetlands of Canada's prairie pothole region. PLoS ONE **9** (3), e92821*
Deze studie gaat specifiek over modellering van ruimtelijke spreiding in een Canadese situatie, en betreft het correleren van gemeten concentraties aan teelten waarin mogelijk neonicotinoïden zijn toegepast conform de toelatingen. Duidelijk is een temporele/seizoensafhankelijke trend (hogere concentraties neonicotinoïden in water ná zaai van behandelde zaden).
De studie is zeer specifiek voor dit type wetlands en niet extrapoleerbaar naar Nederlandse situatie. De bodem-water uitwisseling zal naar alle waarschijnlijkheid niet vergelijkbaar zijn. Ook is specifiek aangegeven dat de hogere persistentie in die regio (Canada) dan in andere regio's/klimaatzones, gerelateerd aan de koudere omstandigheden, een verklaring kan zijn voor het lang terugvinden van de

stoffen. De auteurs verwijzen hierbij naar de grote bandbreedte in persistentie (factor 5 tot 10) van verschillende neonicotinoïden onder veldomstandigheden gerelateerd aan bodemtemperatuur.

*Sanchez-Bayo F. (2014). The trouble with neonicotinoids. Science **346** (6211) 806–807*
Dit betreft een kort overzichtsartikel in de rubriek "perpectives" voorin het blad Science en bevat geen nieuw wetenschappelijk onderzoek. In deze studie wordt het gedrag en lotgevallen van neonicotinoïden alleen benoemd in algemene termen van persistentie en verspreiding.

*Bonmatin J. et al. (2015). Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. Env. Sci. Pollut. Res. **22**, 35–67*
Dit betreft een uitgebreid review artikel waarin informatie over persistentie en voorkomen/verspreiding in het milieu beschreven wordt. Hierin wordt o.a. aangegeven dat in Nederland imidacloprid in de top 3 stoffen valt die de ecotoxicologische norm in oppervlaktewater overschrijdt (de MTR). Dit is bekende informatie die in de beoordelingen wordt meegewogen middels de bestrijdingsmiddelenatlas. Er wordt geen directe link met bepaalde typen toepassingen benoemd. NB Inmiddels is de MTR norm vervangen door de algemene milieukwaliteitsnormen (MKNs) uit de Kaderrichtlijn Water (Jaargemiddelde norm en acute norm, de JG-MKN en de MAC-MKN)

In de twee later verschenen *Nature* publicaties (Kessler et al, 2015; Rundloff et al, 2015) worden geen nieuwe feiten m.b.t. gedrag en lotgevallen in het milieu genoemd.

Resumerend geven de studies de volgende algemene aanwijzingen:
- Neonicotinoïden zijn persistent, met name in de bodem. Het Ctgb hanteert in haar beoordelingen het relevante eindpunt voor Noord-Europese veldstudies (bijvoorbeeld DT50 van 228 dagen voor imidacloprid).
- Neonicotinoïden komen grotendeels in bodem terecht en kunnen vandaar in water terechtkomen.

Constateringen Ctgb met betrekking tot de informatie in het EASAC rapport aangaande het gedrag van neonicotinoïden in het milieu
Het rapport bevat geen nieuwe informatie met betrekking tot eindpunten over gedrag en lotgevallen in milieu, maar is een meer algemene beschrijving van het gedrag van de stoffen. Dit geeft geen reden om eindpunten (bijvoorbeeld persistentie of sorptie) te wijzigen.

Relatie tot blootstellingsmethodieken in het toetsingskader - bodem
De huidige beoordeling van de blootstelling van bodem(organismen) is gebaseerd op de aanname dat 100% van de dosering bij zaadbehandelingsmiddelen in de bodem terechtkomt (de voornaamste focus van het EASAC-rapport). Voor bodemorganismen is de blootstellingsberekening in termen van dosering daarmee adequaat en conservatief. De notie in het EASAC-rapport dat het grootste deel van de dosering in de bodem terechtkomt, wordt dus reeds ondervangen door het toetsingskader.
Voor spuittoepassingen wordt bij de beoordeling van toelaatbaarheid van het risico voor bodemorganismen de interceptie door het gewas meegewogen ter bepaling van de dosering die netto de bodem bereikt. Dit is gewas- en gewasstadiumspecifiek en gebeurt conform Europees afgestemde tabellen (http://focus.jrc.ec.europa.eu/gw/index.html, generic guidance groundwater). Zie ook de Ctgb Evaluation Manual (EU deel, H6, persistentie in bodem, bijlage 3). In toekomstige guidance (http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/4093.pdf, nog niet aangenomen door de Europese Commissie/ Standing Committee on Plants Animal, Food and Feed (SCoPAFF) wordt ook de fractie die op een later tijdstip van de plant afspoelt meegenomen in de berekening van het gehalte in de bodem. Dat is nu nog niet het geval.

Stapeling van residuen in de bodem in volggewassen wordt door Ctgb voor persistente en systemisch werkende zaadbehandelingsmiddelen meegenomen in de risicobeoordeling voor bijen en heeft geleid tot het instellen van wachttijden voor bij-aantrekkelijke volggewassen (per september 2013 ingesteld).

Relatie tot blootstellingsmethodieken in het toetsingskader - oppervlaktewater
De enige concrete verwijzing voor wat betreft de beschreven blootstelling aan oppervlaktewater is naar Van Dijk et al (2013). Deze rapportage is reeds bekend en hierover heeft Ctgb de staatssecretaris per brief geïnformeerd (zie ook onder aquatische organismen). De gehanteerde methodologie betreft uitsluitend correlatieve analyse van verbanden en geeft geen causale verbanden.

Het ontbreken van een drainagemodule in het nationale model voor blootstelling naar oppervlaktewater is een hiaat in het toetsingskader. Op Europees niveau zijn er wel scenario's waarin drainage (horizontaal transport door de bodem naar de sloot) of run-off (afspoeling over het bodemoppervlak naar de sloot) is opgenomen. Uit de stofdossiers van de betreffende middelen blijkt dat (op grond van deze modellen) de blootstelling van de zaadbehandelingstoepassing veel lager is dan die van de spuittoepassing.
Een Nederlandse werkgroep is bezig met de ontwikkeling van een Nederlands specifiek model waarin drainage is opgenomen. Dit is een meer gedetailleerd en op Nederland toegespitst model dan het EU model dat gehanteerd wordt voor de review van actieve stoffen, en door een aantal Europese lidstaten bij de beoordeling van de toelaatbaarheid van middelen. Op dit moment is dit nationale model nog niet afgerond en niet beschikbaar voor gebruik in de toelatingspraktijk.
Voor spuittoepassingen wordt in het huidige toetsingskader emissie via spuitdrift meegenomen conform Nederlands specifieke driftcijfers zoals vastgelegd in regelgeving (BGB) en verder uitgewerkt in de Ctgb Evaluation Manual (NL deel, Hoofdstuk 6 gedrag in water).
Op basis van de beschikbare informatie vanuit monitoring in oppervlaktewater (via de Bestrijdingsmiddelenatlas) blijkt dat er op dit moment geen correlatief verband is aangetoond tussen gemeten concentraties van de actieve stoffen in het oppervlaktewater en teelten waarin de stoffen als zaadbehandeling zijn toegepast. Het Ctgb ziet daarom op dit moment geen directe noodzaak tot een herbeoordeling over te gaan voor de zaadbehandelingsmiddelen voor wat betreft de emissie naar het oppervlaktewater.

- ***Ecotoxicologie***

Bijen en hommels

Overzicht toetsingskader gewasbeschermingsmiddelen en bijen

Voor bijen geldt momenteel het Sanco Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology[1]. Binnen het huidige toetsingskader wordt de honingbij veelal gebruikt als indicatorsoort voor andere soorten bijen zoals hommels en solitaire bijen, en ligt de nadruk in de eerste stap van de risicobeoordeling op de acute toxiciteit. Alleen voor acuut zeer toxische stoffen moet ook naar de toxiciteit op langere termijn gekeken worden.

EFSA heeft een nieuw guidance document voor bijen opgesteld[2]. Dit wordt hierna 'de nieuwe EFSA guidance' genoemd.
De voornaamste wetenschappelijke verbeteringen van de nieuwe EFSA guidance ten opzichte van het huidige toetsingskader zijn dat:

- naast de honingbij, nu ook andere soorten bijen (hommels en wilde bijen) in de beoordeling worden meegenomen,
- de nadruk binnen de risicobeoordeling nu niet alleen meer op de acute risico's ligt, maar ook op de chronische risico's en en risico's voor het larvale stadium.
- meer aandacht wordt gegeven aan de statistische onderbouwing in de beoordeling van veldstudies.

De nieuwe guidance is daarmee aangepast aan de laatste stand der wetenschap.

Tot op heden is het betreffende guidance document nog niet Europees aangenomen en daarmee nog niet geldend. Omdat de herbeoordeling van neonicotinoïden gepland staat voor de tweede helft van 2015, is het naar het oordeel van het College van groot belang om bijtijds een afgestemd toetsingskader beschikbaar te hebben in de vorm van een nieuw guidance document voor bijen.

Vanaf 1 januari 2014 voor stoffen en 1 januari 2016 voor middelen gelden de nieuwe datavereisten[3]. Onder de nieuwe datavereisten moeten voor bijen standaard een chronische toxiciteitstest en een larvale toxiciteitstest geleverd worden, naast de acute toxiciteitstest die ook onder de voorgaande datavereisten al geleverd moest worden. Deze nieuwe eisen gelden niet alleen voor neonicotinoïden, maar voor alle stoffen.

- *Om welke stoffen gaat het?*

Verreweg de meeste studies die in het EASAC-rapport genoemd worden, zijn uitgevoerd met imidacloprid, clothianidin of thiamethoxam. De andere in Nederland toegelaten neonicotinoiden (acetamiprid en thiacloprid) worden zelden gebruikt in de studies. Acetamiprid en thiacloprid verschillen in moleculaire structuur van de andere drie en zijn daardoor zowel minder persistent in de bodem als minder toxisch voor honingbijen. Dit laatste blijkt voor beide stoffen uit data voor acute toxiciteit. Voor thiacloprid blijkt bovendien dat de chronische toxiciteit lager is dan die van imidacloprid en thiamethoxam (Mommaerts et al. 2010, zie de sectie 'studies over effecten van neonicotinoïden op bijen'). Voor thiacloprid is vooral de mogelijke synergistische werking met de parasiet Nosema onderzocht, en hoewel deze in sommige laboratoriumstudies wordt gevonden, wordt dit niet bevestigd in andere laboratoriumstudies, noch in meer realistische setting (zie de sectie 'studies over combinatie-effecten van neonicotinoïden met ziekten en plagen'). De auteurs van het EASAC-rapport spreken bijna overal over neonicotinoiden in het algemeen, maar het is de vraag of het voor bijen wel gerechtvaardigd is om de resultaten van onderzoek met imidacloprid, clothianidin en thiamethoxam door te trekken naar acetamiprid en thiacloprid.

- *Blootstellingsroutes voor bijen*

Het EASAC-rapport gaat in op een aantal routes via welke niet-doelwit arthropoden inclusief bijen blootgesteld kunnen worden. De benoemde blootstellingroutes via nectar en stuifmeel, directe bespuiting,

[1] SANCO/10329/2002, 17 October 2002 rev 2 final. Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology Under Council Directive 91/414/EEC.
[2] European Food Safety Authority, 2013. EFSA Guidance Document on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). EFSA Journal 2013;11(7):3295, 268 pp., doi:10.2903/j.efsa.2013.3295
[3] Commission Regulations 283/2013 (stof) en 284/2013 (middel)

stofdrift van gecoat zaad, oppervlaktewater en guttatiewater zijn voor bijen reeds (kwantitatief of kwalitatief) betrokken in de toelatingsbeoordeling.
De route via honingdauw wordt niet genoemd maar is ook een belangrijke blootstellingsroute, welke op dit moment niet in de nieuwe EFSA guidance is opgenomen. Het is van belang dat deze blootstellingsroute, door opname in het Europees toetsingskader, onderdeel wordt van de risicobeoordeling.
De ook in het EASAC-rapport genoemde blootstellingsroutes via contact met residuen op bijvoorbeeld bladeren of stengels, verontreinigd nestmateriaal of nestelplekken, residuen in de bodem die naar naastgelegen bodems of water lekken, en doorgave via trofische niveau's worden momenteel niet in Nederland meegenomen en zijn ook niet uitgewerkt tot risicobeoordelingsmethodieken in de nieuwe EFSA bijenguidance. Het belang van deze blootstellingsroutes ten opzichte van blootstellingsroutes die wel deel uit maken van het toetsingskader is op dit moment niet goed te kwantificeren. Naar de mening van Ctgb zijn de meeste hiervan van mineur belang vergeleken met de routes die al wél meegenomen zijn. De route via verontreinigd nestelmateriaal of nestelplekken, met name via de bodem, is potentieel wel van belang. Er is echter meer onderzoek nodig voordat concentraties in de bodem gekoppeld kunnen worden aan een effect op bijen (zoals de nieuwe EFSA guidance al aangeeft). Ook de openbare literatuur gaat alleen in op blootstelling via nectar en stuifmeel en bevat geen onderzoek dat de effecten van blootstelling via andere routes zoals de bodem onderzoekt. Op dit moment is het naar de mening van Ctgb niet nodig om de huidige toelatingssituatie van imidacloprid, thiamethoxam en clothianidin te wijzigen in verband met deze blootstellingsroutes.

- *Directe blootstelling van honingbijen*

Het EASAC-rapport gaat alleen in op het risico van stofdrift bij behandeld zaad. Hierbij komen tijdens het zaaien stofdeeltjes vrij die de actieve stof bevatten. Deze deeltjes kunnen overwaaien naar een naburig gewas of een akkerrand. Als hier bloeiende planten staan waar honingbijen op vliegen, kunnen deze een dodelijke blootstelling krijgen, wat blijkt uit incidenten met honingbijen in verschillende landen. In Nederland wordt sinds 2010 rekening gehouden met deze blootstellingsroute. Voor alle zaadcoatings met insecticide is geinventariseerd hoe de coating plaatsvindt, of de zaden in het veld gezaaid worden en met welke machines. Indien er risico bestond voor het ontstaan van stofdrift, zijn aanvullende eisen gesteld aan de manier van coaten en uitzaaien, zodat de mogelijke blootstelling tot een aanvaardbaar niveau wordt teruggedrongen. Deze aanpak wordt nu ook bij nieuwe aanvragen gevolgd. Overigens zijn er in Nederland nooit incidenten geweest met stofdrift en honingbijen. Kanttekening hierbij is dat vanwege vrij verkeer van behandeld zaad binnen Europa het niet is uit te sluiten dat behandeld zaad zonder stofdriftrestricties toch in Nederland uitgezaaid wordt.
De situatie in Canada, die door het EASAC-rapport in het bijzonder wordt aangehaald, is erg worst case. In de Canadese gebieden met incidenten wordt soms wel 90% van een gebied min of meer tegelijkertijd ingezaaid met gecoat zaad. Dit is niet representatief voor Nederland.

Directe blootstelling kan ook plaatsvinden via bespuiting met een vloeibaar middel. Het EASAC-rapport gaat hier niet op in. De meeste insecticiden mogen uiteraard niet op bloeiend gewas gespoten worden omdat het risico voor bijen dan veel te groot is (zij kunnen dan overspoten worden), maar in Nederland worden aanvullend ook nog eisen gesteld aan de maximale blootstelling die buiten het veld mag plaatsvinden. Via strenge driftreductietechnieken wordt deze tot een aanvaardbaar niveau teruggedrongen. Deze aanvullende eis zal ook deel uitmaken van de nieuwe EFSA guidance.

Indirecte blootstelling van bijen via residuen in planten wordt onder het volgende kopje besproken.

- *Toxische effecten van residuen in planten (op honingbijen)*

Het EASAC-rapport geeft in tabel A4.2 een overzicht van concentraties in nectar en stuifmeel na zaadcoating en na 'drenching', druppelbehandeling of het anderzins doorweken van een bodem of substraat met vloeistof waarin een werkzame stof is opgelost. De gehaltes na drenching zijn veel hoger dan bij zaadbehandeling. Dit is niet vreemd, aangezien bij bevloeiing en druppelbehandeling volgroeide en soms al bloeiende planten worden behandeld en de actieve stof (a.s.) direct naar de bloem kan worden getransporteerd, terwijl bij zaadbehandeling eerst de plant nog uit het zaad moet opgroeien voor er een bloem kan ontstaan. Er worden geen residugehaltes gegeven voor toepassing na bespuiting.

Blootstelling aan nectar of stuifmeel uit bloemen die behandeld zijn via drenching of bespuiting, kan volgens de auteurs zulke hoge concentraties tot gevolg hebben dat deze tot directe sterfte van bijen kunnen leiden. Voor zover Ctgb bekend is in Nederland nog nooit een relatie is gevonden tussen een

toegelaten toepassing van een neonicotinoïde en sterfte van honingbijen, terwijl onverwachte sterfte van honingbijen door de imker gemeld kan worden aan de NVWA en er dan onderzocht wordt of er een relatie is met een bestrijdingsmiddel. Op basis hiervan verwacht Ctgb in Nederland in bloeiende planten geen concentraties die kunnen leiden tot acute sterfte van honingbijen.

Bij een risicobeoordeling van een middel dat in Nederland in aanvraag is wordt gekeken welke residugehaltes te verwachten zijn bij dat specifieke gewas bij de specifieke teeltomstandigheden. Ook wordt rekening gehouden met alle meetwaardes, inclusief gemiddeldes en ranges. In het EASAC-rapport worden residugehalten genoemd zonder informatie over de in het bijbehorende onderzoek gebruikte dosering, toepassingstijdstip etc. De getallen die genoemd worden in het EASAC-rapport zijn dus niet zomaar door te trekken naar de Nederlandse situatie.

Voor zaadbehandeling noemt het EASAC-rapport alleen residugehalten in koolzaad, maïs en zonnebloem. Imidacloprid, thiamethoxam en clothianidin zijn echter momenteel, conform de Europese restricties, niet toegelaten in bij-aantrekkelijke gewassen die in het veld behandeld worden.

De belangrijkste blootstellingsroute voor bijen is via nectar en pollen van direct behandeld gewas. Met het verbieden van toepassing in bij-aantrekkelijke gewassen is deze route uitgeschakeld. Via driftreducerende maatregelen wordt belasting buiten het veld tot een minimum teruggebracht. Ctgb acht ook de blootstelling via onkruiden in het veld, drinkwater en volggewassen laag, omdat significante aantallen bloeiende onkruiden in het veld niet passen bij een effectieve landbouwpraktijk, de belasting via drinkwater nog onduidelijk is en ook in de nieuwe EFSA guidance van mineur belang is, en omdat voor bij-aantrekkelijke volggewassen wachttermijnen zijn opgelegd. Het Ctgb ziet daarmee geen reden om op dit moment in te grijpen in de bestaande Nederlandse toelatingen.

De andere twee in Nederland toegelaten neonicotinoïden, thiacloprid en acetamiprid, mogen wel in het veld toegepast worden op bij-aantrekkelijke gewassen. Wat betreft de risico's van het gebruik van deze stoffen is het Ctgb echter van mening dat er op dit moment onvoldoende aanleiding is om in te grijpen in de bestaande Nederlandse toelatingen (zie paragraaf, 'om welke stoffen gaat het?').

- *Letale en subletale effecten op honingbijen*

In twee in het EASAC-rapport aangehaalde artikelen, Goulson (2013) en Godfray et al (2014) (omdat dit overzichtsartikelen zijn die geen eigen onderzoek bevatten, gaat Ctgb niet in detail in op deze reviews), wordt geconcludeerd dat veldrealistische concentraties in nectar en stuifmeel geen schadelijke directe effecten op honingbijen opleveren. Het EASAC-rapport benadrukt echter dat subletale effecten, bijvoorbeeld effecten op navigatiecapaciteit, leergedrag of communicatie, zulke ernstige effecten kunnen hebben op een honingbijvolk dat ze instorting van het volk tot gevolg kunnen hebben, zelfs al zijn er geen direct letale effecten op individuele honingbijen (Desneux et al. 2007, ook dit betreft een review zonder eigen onderzoek, derhalve gaat Ctgb hier niet in detail op in). Het EASAC-rapport haalt 21 studies aan (in Box A4.1) en concludeert daaruit dat het nodig is om de risicobeoordeling voor bijen te baseren op neuro-ontwikkelings- en neurogedragseindpunten. Dit zijn allemaal studies die een bepaald effect beschrijven dat de auteurs zelf onderzocht hebben. Vanwege het belang van deze studies worden ze allemaal apart besproken (zie de sectie 'studies over effecten van neonicotinoïden op bijen).

Volgens de datavereisten kunnen subletale effecten zoals gedrags- en reproductie-effecten op bijen en, indien toepasbaar, op bijenvolken, gevraagd worden. Het is op basis van de huidige kennis echter moeilijk om subletale effecten die in laboratoriumstudies gevonden worden, in een risicobeoordeling te gebruiken. Het moet dan bekend zijn hoe zo'n effect ingrijpt op de populatie. Dit is voor sommige effecten makkelijker in te schatten dan voor andere, maar voor geen enkel effect is de exacte invloed bekend. Ook moet een blootstellingsroute bekend zijn en moeten er triggerwaarden zijn om een effect/blootstellingsverhouding mee te vergelijken. Al deze dingen ontbreken nu, en Ctgb kan dus niet zomaar subletale effecten meenemen in de risicobeoordeling. Ook in de nieuwe EFSA guidance worden subletale effecten niet meegenomen. Op pagina 10 staat hierover: '*sublethal effects observed in individual bees have the potential to affect the development and the survival of the colonies. However, it is not possible with the information available to the working group to make a quantitative link between sublethal effects observed in first tier laboratory studies and effects on colonies. This could underestimate the risk in lower tiers*'

Het beschermdoel voor bijen is volgens de Uniforme Beginselen: geen onaanvaardbare effecten op de larven en het gedrag van de honingbij, de overlevingskans van de kolonie en de ontwikkeling hiervan. De Uniforme Beginselen zijn op dit moment nog niet aangepast aan de nieuwe EFSA guidance.

In het huidige toetsingskader is dit beschermdoel niet duidelijk uitgewerkt. In hogere tier effectstudies worden meestal de parameters mortaliteit van volwassen bijen, gedrag inclusief foerageergedrag, en status van het volk inclusief broed meegenomen. Er is expert judgement vereist voor de interpretatie van de studieuitkomsten.

In de nieuwe EFSA guidance ligt meer vast over het beoordelen of het beschermdoel gehaald wordt.

Het specifieke beschermdoel voor honingbijen in de EFSA guidance is (uit hoofdstuk 2): *the magnitude of effects on colonies should not exceed 7% reduction in colony size. Foragers mortality should not be increased compared with controls by a factor of 1.5 for six days or a factor of 2 for three days or a factor of 3 for two days.*
Voor stoffen die alleen effecten hebben op larven, zijn broedeffecten de relevante parameter in semi-veld en veldtesten (GD Appendix O, p. 211).
Voor stoffen die (ook) effecten hebben op volwassen bijen, zijn in hogere tier testen de volgende parameters relevant:
- primaire parameters: mortaliteit van foerageersters, aantal bijen in het volk, overwintersucces.
- Secundaire parameters: gedragseffecten inclusief foerageergedrag

De secundaire parameters hebben geen link met het specifieke beschermdoel en kunnen dus op zichzelf geen aanleiding geven voor een beslissing tot afwijzing of restricties. Ze kunnen wel helpen om effecten op de primaire parameters beter te begrijpen.

Er zijn diverse studies met honingbijen die bij een niet volledig realistisch blootstellingsregime een effect vinden op één of meerdere subletale parameters van honingbijen. Bijvoorbeeld Hatjina et al. 2013 (op ademhaling en de structuur van een klier), Henry et al. 2012 (nestterugvindcapaciteit), of Sandrock et al. 2014 (verlaagde broedproductie). Uit studies op veldniveau met volledig realistisch blootstellingsregime voor zaadbehandeling van een bloeiend gewas (Cutler et al., 2014, Rundlöf et al. 2015) blijken echter geen schadelijke effecten op honingbijen.

- *Honingbijen en andere bijen*

Het EASAC-rapport wijst er op dat effectdata voor de honingbij niet per se relevant zijn voor andere bijen.

Het huidige toetsingskader voor bijen gebruikt de honingbij als indicatorsoort voor andere bijen. De intrinsieke gevoeligheid van de honingbij kan verschillen van andere soorten, maar belangrijker nog, de blootstellingsroutes zijn soms heel anders. Sommige solitaire bijen nestelen bijvoorbeeld in de bodem en worden dus mogelijk blootgesteld aan bodemconcentraties van bestrijdingsmiddelen. Deze route is voor de honingbij niet relevant. Verder maakt de sociale levenswijze van de honingbij dat effecten op individuele honingbijen niet per se effect hoeven te hebben op het voortbestaan van het volk. Bij een negatief effect op een solitair levend insect is er een veel grotere kans op een verstoring van de reproductie van dat individu.

De meeste studies uit de openbare literatuur zijn uitgevoerd met doseringen die relevant zijn voor zaadbehandelingen van gewassen die later gaan bloeien (zoals koolzaad). Zoals hierboven besproken blijken uit studies op veldniveau met volledig realistisch blootstellingsregime geen schadelijke effecten op honingbijen. Voor niet-honingbijen zijn vooral studies uitgevoerd met hommels en maar weinig met andere soorten bijen, en veel van deze studies zijn onder (gedeeltelijke) laboratoriumomstandigheden uitgevoerd. Hieruit blijkt dat op hommels en solitaire bijen mogelijk schadelijke effecten zouden kunnen optreden bij blootstelling aan zaadbehandelde bloeiende gewassen. Zie bijvoorbeeld Cresswell et al. 2012 (voedselopname en bewegingsactiviteit van hommels, terwijl in dezelfde studie geen effect werd gevonden op die parameters in honingbijen), Laycock et al. 2012 (vermindering van broedproductie van hommels), Whitehorn et al. 2012 (volkgewicht en productie van koninginnen bij hommels) of Sandrock et al. 2013 (verlaagde reproductie bij een solitaire bij).
Tot voor kort was dit nooit onderzocht op veldniveau bijvolledig realistisch blootstellingsregime, maar in een recent onderzoek dat in Nature is gepubliceerd (Rundlöf et al. 2015, zie bespreking elders in dit document) uitgevoerd onder volledig realistisch blootstellingsregime in het veld, blijkt dat, onder de omstandigheden van de studie, zaadcoating met clothianidin van koolzaad geen negatieve effecten had op honingbijen, maar wel op hommels en solitaire bijen.

Het nieuwe EFSA guidance document is onder andere ontwikkeld om meer aandacht te besteden aan andere bijen dan de honingbij. Er worden in deze guidance ook toxiciteitsdata gevraagd voor andere soorten en er is methodiek ontwikkeld om de risico's in te schatten. Als deze guidance straks gebruikt gaat worden, zal de risicobeoordeling dus beter dekkend zijn voor alle soorten bijen.

Voor hommels en solitaire bijen zijn de eerste tier triggers gebaseerd op dezelfde criteria als voor honingbijen, maar dan met een aanvullende veiligheidsfactor.

In hogere tier studies worden voor hommels en solitaire bijen wél subletale parameters expliciet meegenomen. De volgende beschermdoelen worden gegeven:

- Voor hommels (in Appendix P): *The effects should not be more than 7% on total reproductive output, queen versus male production and queen survival and capacity to nest.*
- Voor solitaire bijen (in Appendix Q): *not more than 7% difference compared to controls in cell production rate, off-spring production and sex ratio, progeny survival and vigour (the vigour can be assessed measuring the adult longevity after emergence) until next spring.*

Met de nieuwe EFSA guidance wordt de bescherming van alle soorten bijen beter gewaarborgd. Op basis van de openbare literatuur en dan vooral de studie van Rundlöf, beveelt Ctgb aan de nieuwe EFSA guidance zo snel mogelijk in te voeren.

Ctgb merkt wel op dat het guidance document weinig aandacht besteed aan blootstellingsroutes die niet voor de honingbij gelden maar wel voor andere bijen (op pagina 11 van de guidance staat: *'exposure by residues in the soil is not currently considered in the risk assessment scheme because it was not possible to link the concentration in the soil to the effects on bees'*). Ook wordt blootstelling via was en honingdauw niet meegenomen, routes die voor allerlei soorten bijen (inclusief de honingbij) van belang kunnen zijn. Er blijven dus ook bij ingebruikname van de nieuwe guidance blootstellingsroutes onderbelicht. Dit is in dit document reeds besproken (in paragraaf 'blootstellingsroutes voor bijen') Toepassing van imidacloprid, clothianidin en thiamethoxam als zaadcoating in bij-aantrekkelijk gewas, waar de meeste studies op gericht zijn, is momenteel in Europa niet toegestaan. Voor spuit- en andere typen toepassing in bloeiende gewassen zijn vrijwel geen residugegevens aanwezig en het is daarom moeilijk te zeggen of de in de studies geteste doseringen relevant zouden zijn voor bespuiting vóór of tijdens de bloei. Spuittoepassing in bloeiende gewassen in het veld is momenteel alleen toegestaan ná de bloei, en ook alle andere typen toepassing zijn alleen toegestaan in het veld in gewassen die niet in bloei komen. Met het verbod op toepassing in bloeiende gewassen is een belangrijke blootstellingsroute voor alle soorten bijen (en ook andere bloembezoekende arthropoden) uitgeschakeld. Ctgb beveelt aan dit verbod te handhaven tot onderzoek heeft uitgewezen dat er geen schadelijke effecten zijn.

- *Acute vs. chronische effectdata*

Het EASAC-rapport noemt verschillende onderzoeken waarin geconcludeerd wordt dat de toxiciteit van een bepaalde dosering imidacloprid hoger wordt naarmate de geteste organismen langer blootgesteld werden. Bijvoorbeeld Charpentier et al. 2014 (bij fruitvliegjes, zie bespreking elders in dit document); Suchail et al. 2001 (bij de honingbij, dit onderzoek wordt besproken in de DAR[4] van imidacloprid); Oliveira et al. (bij een tropische angelloze bij, zie bespreking elders in dit document); en Rondeau et al. 2014, vergelijking van gepubliceerde acute en chronische toxiciteitsdata van imidacloprid voor mieren, termieten en honingbijen, dit artikel is niet in detail besproken. Op basis hiervan wijst het EASAC-rapport er op dat alleen onderzoek naar acute sterfte niet voldoende is. Dit is een valide punt, zeker voor stoffen die langere tijd in voedselbronnen aanwezig kunnen zijn. De nieuwe datavereisten voor bijen eisen daarom niet alleen een acute mortaliteitstest (6 uur blootstelling, observatie maximaal 96 u) maar ook een chronische (10 dagen lang blootstelling en observatie). Bovendien vraagt de nieuwe EFSA guidance om, als er aanwijzingen zijn voor accumulatieve toxiciteit, dit verder te testen in hogere tier studies.

- *Veldeffectstudies*

Momenteel wordt de risicobeoordeling gericht op effecten op honingbijvolkniveau in het veld. De auteurs van het EASAC-rapport stellen dat het bijzonder moeilijk is om goede veldstudies uit te voeren om verschillende redenen:

---

[4] Draft Assessment Report, het rapport dat opgesteld wordt voor evaluatie van een actieve stof op Europees niveau. Suchail et al. 2001 wordt besproken in Imidacloprid DAR Vol.3 B.9 van 30 December 2005.

- vanwege de aanzienlijke straal van het foerageergebied rond een volk van zowel honingbijen als hommels, waardoor overlap tussen controle en testvelden makkelijk optreedt:
- omdat neonicotinoiden zoveel gebruikt worden dat het moeilijk is een onbesmette controlelocatie te vinden;
- omdat er zoveel variabelen in een veldsituatie zitten dat het twijfelachtig is of één experiment subtiele effecten wel voldoende dekt en extrapolatie naar andere situaties lastig is;
- en vanwege het feit dat er zoveel andere factoren dan bestrijdingsmiddelen meespelen bij de gezondheid van bijen.

Ctgb merkt op dat de EFSA deze problemen met veldstudies heeft onderkend en in haar nieuwe guidance document bijzonder strenge eisen stelt aan veldstudies, maar dat het in EFSA's optiek mogelijk blijft om veldstudies uit te voeren als hoogste tier van de risicobeoordeling. Ctgb sluit zich hierbij aan.

- *Cumulatieve effecten*

Het EASAC-rapport noemt voorts het onderwerp dat bijen niet slechts aan één stof tegelijkertijd worden blootgesteld, maar aan verschillende stoffen. Zoals blijkt uit diverse onderzoeken, worden er veel verschillende stoffen aangetroffen in honingbijvolken, zowel insecticiden en fungiciden als acariciden (tegen Varroa) en andere gewasbeschermingsmiddelen.

De risicobeoordeling van een aangevraagd middel behandelt alleen de risico's van de stof of stoffen die in dat middel zitten, en eventueel additioneel de risico's van bij naam en met dosering genoemde stoffen in een tankmix. In de praktijk worden middelen heel vaak tegelijk of vlak na elkaar toegepast. Bijen (en overigens ook alle andere niet-doelwitorganismen) worden dus tegelijkertijd of vlak na elkaar belast met verschillende stoffen, en het is te verwachten dat de effecten van de individuele stoffen (deels) opgeteld kunnen worden. Uit sommige studies (bijvoorbeeld Gill et al. 2012, besproken in dit document) blijkt dit inderdaad, zij het in niet volledig realistisch blootstellingsregime. Dergelijke cumulatieve effecten worden momenteel niet in de risicobeoordeling meegenomen.
Inmiddels zijn op Europees niveau initiatieven (door EFSA) gestart om te onderzoeken op welke wijze cumulatieve effecten binnen de risicobeoordeling van gewasbeschermingsmiddelen meegenomen kunnen worden. Mede vanwege de complexiteit van dit onderwerp is het niet te verwachten dat deze effecten op korte termijn deel zullen uitmaken van het vigerende toetsingskader. Er bestaan vele onbekende factoren in een cumulatieve beoordelingsaanpak, en beïnvloedende factoren zijn niet alleen het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen, maar bijvoorbeeld ook landbouwmethodieken en lokale biodiversiteit, waarbij het zeer complex is om tot een protocol te komen dat kan worden toegepast in de beoordelingssystematiek voor de toelating.
De risico's van het optreden van synergisme (de toxiciteit van een mengsel is hoger dan de optelsom van de toxiciteit van de afzonderlijke componenten) zijn door Ctgb onderzocht in opdracht van het ministerie van Economische Zaken, met speciale focus op acetamiprid en thiacloprid. Op basis van studies waar veldrelevante concentraties zijn getest op synergisme heeft het College geconcludeerd dat er op dat moment geen aanleiding was om de middelen op basis van acetamiprid en thiacloprid versneld nationaal te herbeoordelen. Het Ctgb heeft de Staatssecretaris van EZ hierover in juni 2014 per brief geïnformeerd. Sindsdien is geen nieuwe informatie gekomen over synergisme tussen actieve stoffen, waardoor deze conclusie nog steeds geldt.

- *Combinatie-effecten van neonicotinoïden met ziekten en plagen*

Het EASAC-rapport handelt ook over de mogelijke interacties tussen insecticiden en ziekten en plagen. De studies waar naar wordt gerefereerd zijn veelal geheel of gedeeltelijk uitgevoerd in het laboratorium of zelfs op moleculair niveau en over het algemeen met erg hoge doseringen Nosema (een parasiet) en actieve stof. Zie bijvoorbeeld Pettis et al. 2012, Vidau et al. 2011 of Retschnig et al. 2014 voor honingbijen (overigens zijn de uitkomsten van deze studies niet met elkaar in overeenstemming voor wat betreft de dosering waarbij synergistische effecten worden gevonden), of Fauser-Mislin et al. 2014 voor hommels. In de enige studie waar met een meer realistisch (hoewel nog steeds niet volledig veldrealistisch) blootstellingsregime is gewerkt (Retschnig et al. 2015) werd géén synergistisch effect gevonden.

Het is algemeen bekend dat organismen gevoeliger zijn voor een stressor (zoals een bestrijdingsmiddel) als zij tegelijkertijd aan een andere stressor (zoals een ziekte, of bijvoorbeeld voedselgebrek) blootgesteld worden. Het huidige toetsingskader biedt echter geen ruimte om dit mee te nemen. Geteste organismen moeten vrij zijn van ziekten, of in ieder geval van symptomen van ziekte. De momenteel beschikbare studies naar interacties geven soms tegenstrijdige informatie en zijn meestal niet uitgevoerd

onder realistische situaties, waardoor de resultaten niet direct toepasbaar zijn in de risicobeoordeling. Ctgb beveelt aan meer aandacht te besteden aan interacties tussen stressoren in toekomstige risicobeoordelingsmethodiek.

- *Overige opmerkingen*

Het EASAC-rapport (paragraaf A4.3.4.) gaat in op de daadwerkelijke risicobeoordeling. Hierbij verwijst het EASAC-rapport naar EFSA (2013a, b en c) waarin de op dat moment in Europa toegelaten toepassingen van imidacloprid, clothianidin en thiamethoxam als zaadbehandeling en granulaat beoordeeld werden op risico's voor bijen. Deze beoordelingen waren gebaseerd op een wetenschappelijke opinie van EFSA maar nog niet op een uitgewerkte methodiek. Inmiddels is het nieuwe EFSA guidance document beschikbaar. In 2015 voert de EFSA een beoordeling uit van de risico's voor bijen van dezelfde stoffen maar nu voor alle overige toepassingen (onder andere bespuiting en bevloeiing), en zij doen dit nu volgens hun nieuwe guidance. De resultaten van deze beoordeling worden in 2016 verwacht.

De tabellen A4.4 en A4.5 van het EASAC-rapport presenteren voor imidacloprid de chronische NOEC, de residuniveau's in nectar en in dieet van voedsterbijen, en de ratio hiertussen (alle waarden komen uit EFSA 2013a). Alle ratio's zijn een factor 2,9 of meer, wat betekent dat de chronische NOEC niet bereikt wordt. De auteurs stellen echter dat er onzekerheden zitten in deze berekeningen, waarbij zij waarschijnlijk doelen op aspecten die zij in de eerste alinea van hun paragraaf A4.3.4 noemen. Deze worden hieronder beschreven met een oordeel van Ctgb over de onzekerheid van elk aspect:

- welk effect in beschouwing wordt genomen (individueel of volkniveau): de NOEC die hier gebruikt wordt, is een waarde voor chronische mortaliteit in het laboratorium. Het feit dat subletale effecten niet worden meegenomen leidt mogelijk tot onderschatting van het risico, maar de blootstelling in de studie was worst case ten opzichte van de situatie in het volk en zal naar alle waarschijnlijkheid niet leiden tot onderschatting van het risico.
- Welke bijensoort getest wordt: aangezien dit hoofdstuk 'risico voor honingbijen' heet, lijkt Ctgb het eindpunt voor honingbijen relevant en zal dit niet leiden tot onderschatting van het risico. Er is tot op heden geen overtuigend bewijs geleverd dat verschillende honingbijrassen een verschillende gevoeligheid hebben.
- Hoe het insecticide gebruikt wordt (zaadbehandeling, bespuiting of bevloeiing): de EFSA heeft hier expliciet zaadbehandelingen beoordeeld dus dit is gewoon onderdeel geweest van de risicobeoordeling; dit is geen onderschatting van het risico.
- Oneigenlijk gebruik: Risicobeoordelingen van bestrijdingsmiddelen worden door Ctgb altijd uitgevoerd met de aanname dat gewasbeschermingsmiddelen correct (conform gebruiksvoorschrift) worden toegepast.

Verder wijzen de auteurs op de route via guttatie. Zij stellen terecht dat guttatievloeistof in zaailingen uit behandeld zaad toxisch kan zijn voor een bij, mits deze vloeistof een significant aandeel heeft in de watervoorziening van die bij. Verschillende experimenten suggereren dat honingbijen zelden guttatievloeistof opnemen, waardoor in de praktijk een laag risico verwacht wordt. De auteurs vinden dat het voorkomen van bijzonder hoge concentraties in guttatievloeistof leidt tot significante onzekerheden. Ctgb heeft in beoordelingen tot op heden de blootstellingsroute van honingbijen via guttatie kwalitatief meegenomen. Met de nieuwe EFSA guidance komt kwantitatieve methodiek beschikbaar.

Als laatste noemen de auteurs een aantal artikelen waarin de meerdere oorzaken van achteruitgang van honingbijen worden besproken. Het is algemeen geaccepteerd, ook bij het Ctgb, dat gewasbeschermingsmiddelen hier niet de enige oorzaak van zijn. Ziekten en plagen en intensivering van de landbouw (waardoor de beschikbaarheid van bloemen in het landschap afnam) spelen zeker een grote rol. De rol van bestrijdingsmiddelen (en dus niet alleen neonicotinoïden) is nog altijd niet duidelijk. Momenteel vindt een groot monitoringsonderzoek (alleen gericht op honingbijen) plaats in opdracht van EZ[5] waarin wordt gekeken naar de gezondheid, omgevingsfactoren en belasting met bestrijdingsmiddelen van bijenvolken in Nederland. Het onderzoek wordt uitgevoerd door een consortium dat bestaat uit Naturalis, Bijen@wur, Alterra en het Nederlands Centrum voor Bijenonderzoek (NCB). Het loopt tot eind 2017 en zal hopelijk meer duidelijkheid geven over de rol van bestrijdingsmiddelen.

---

[5] http://www.wageningenur.nl/nl/nieuws/Nieuw-meerjarig-observatieonderzoek-surveillance-studie-bijengezondheid-in-Nederland.htm

Constateringen Ctgb met betrekking tot de informatie in het EASAC rapport aangaande bijen:
De beschreven effecten van het gebruik van neonicotinoïden zijn bekend en zijn veelal onderdeel van het toetsingskader waarbinnen het Ctgb gewasbeschermingsmiddelen beoordeelt. Een aantal beschreven effecten, zoals blootstelling van neonicotinoïden aan bijen via bloeiende gewassen, is reeds beoordeeld binnen de Europese herbeoordeling van neonicotinoïden in 2013 en heeft geleid tot Europese restricties op het gebruik van neonicotinoide-houdende gewasbeschermingsmiddelen. Verder wordt opgemerkt dat veel aangehaalde studies, die effecten van neonicotinoïden beschrijven, niet relevant zijn voor de Nederlandse landbouwkundige- en toelatingssituatie omdat de proefomstandingheden niet overeenkomen met de in Nederland toegelaten toepassingen.

Het EASAC-rapport en de Nature publicaties halen daarnaast ook effecten aan van het gebruik van neonicotinoïden die reeds bekend zijn, maar nog geen onderdeel uitmaken van het huidige toetsingskader:

- Binnen het huidige toetsingskader wordt de honingbij veelal gebruikt als indicatorsoort voor andere soorten bijen zoals hommels en solitaire bijen. Er zijn steeds meer aanwijzingen, die ook in het EASAC-rapport en Nature publicaties worden aangehaald, dat dit wetenschappelijk niet geheel juist is. De intrinsieke gevoeligheid van de honingbij kan verschillen van andere soorten en de blootstelling aan gewasbeschermingsmiddelen kan op andere manieren plaatsvinden. Verder maakt de sociale levenswijze van de honingbij dat effecten op individuele bijen geen effect hoeven te hebben op het voortbestaan van het volk. Bij een negatief effect op een solitair levend insect is er een veel grotere kans op een verstoring van de reproductie van dat individu.
- Anderzijds, de beperkende maatregelen die bijen moeten beschermen tegen blootstelling aan neonicotinoïden zijn in het algemeen ook beschermend voor andere bestuivers dan bijen, dus het feit dat andere bestuivers niet als indicatorsoort worden meegenomen wil niet zeggen dat de blootstelling bij het huidige gebruik daarmee onaanvaardbaar zou zijn. Het Ctgb onderschrijft dat de honingbij niet in alle gevallen als indicatorsoort kan worden gebruikt. Met de ontwikkeling van het nieuwe 'guidance document on bees' zal meer aandacht komen voor hommels en solitaire bijen binnen de risicobeoordeling van gewasbeschermingsmiddelen. Nederland heeft de afgelopen jaren een actieve rol gespeeld in deze ontwikkeling.
- Het rapport gaat ook in op het feit dat bijen en andere organismen niet alleen worden blootgesteld aan één stof tegelijkertijd maar wellicht ook aan meerdere afzonderlijke stoffen, het zogenaamde cumulatieve effect. Dit zou in sommige situaties tot een mogelijke onderschatting van de daadwerkelijke milieurisico's kunnen leiden. EFSA is verzocht dit in kaart te brengen en voorstellen te doen of en zo ja hoe deze effecten kunnen worden beoordeeld.
- Het is algemeen bekend dat organismen gevoeliger zijn voor een stressor (zoals een bestrijdingsmiddel) als zij tegelijkertijd aan een andere stressor (zoals een ziekte, of bijvoorbeeld voedselgebrek) blootgesteld worden. Het huidige toetsingskader biedt echter geen ruimte om dit mee te nemen. Geteste organismen moeten vrij zijn van ziekten, of in ieder geval van symptomen van ziekte. De momenteel beschikbare studies naar interacties geven soms tegenstrijdige informatie en zijn meestal niet uitgevoerd onder realistische situaties, waardoor de resultaten niet direct toepasbaar zijn in de risicobeoordeling. Ctgb beveelt aan meer aandacht te besteden aan interacties tussen stressoren in toekomstige risicobeoordelingsmethodiek.

- *Bespreking van individuele studies uit de openbare literatuur*

De volgorde van bespreking van studies volgt zoveel mogelijk het EASAC-rapport. Waar Ctgb dit nodig vond, is de volgorde gewijzigd en zijn studies toegevoegd.
Voor elke studie is een korte en een uitgebreide samenvatting opgenomen. Naarmate een artikel potentieel meer belang zou kunnen hebben voor de risicobeoordeling (dit is bijvoorbeeld het geval als het een veldstudie betreft), zijn de samenvattingen langer.

Studies over effecten van neonicotinoïden op bijen

- *Effect op honingbijen tijdens het zaaien van maïs. Girolami et al. (2011, 2012) en Tapparo et al. (2012)*

  Bij Girolami et al. lijkt een fout geslopen te zijn in de referentie in het EASAC-rapport. De titel van het artikel verwijst naar een publicatie van dezelfde auteurs uit 2011. Een vergelijkbare publicatie uit 2012 draagt een andere titel. Alledrie de artikelen gaan over de effecten op honingbijen die door stofwolken vliegen die ontstaan tijdens het zaaien van maïs. Hieruit blijkt dat bijen bij gebruik van zaaimachines die de lucht omhoog blazen een dodelijke blootstelling kunnen oplopen in het veld, mits ze daarna in hoge luchtvochtigheid worden gehouden. Bij zaaimachines met

deflectoren is de sterfte veel minder. Deze artikelen gebruiken een worst case blootstellingsmethode. De blootstellingsroute via stofdrift dat op bloeiende planten buiten een ingezaaid veld terecht komt, lijkt relevanter voor populatie-effecten op bijen. Om stofdrift buiten het veld zoveel mogelijk te voorkomen zijn in Nederland sinds 2010 maatregelen ingesteld die deflectoren op maiszaaimachines verplicht stellen (dit leidt bovendien tot een reductie van de stofwolken ín het veld). Deze artikelen zijn dus niet relevant voor de huidige Nederlandse situatie. Zij benadrukken hooguit de noodzaak om in de risicobeoordeling rekening te houden met stofdrift bij uitzaaien van behandeld zaad, wat al gebeurt in Nederland. Vanwege het onrealistische blootstellingsregime in deze studies wordt geen uitgebreide samenvatting gegeven.

- *Effect op fruitvliegen van acute en chronische blootstelling aan imidacloprid* Charpentier et al. 2014

Bij blootstelling in het laboratorium lag de acute LC50 voor fruitvliegjes hoger dan de chronische. Met betrekking tot de vruchtbaarheid werd geen dosis-reponse relatie gevonden. De studie levert geen echte nieuwe bruikbare informatie op inzake het werkingsmechanisme of de relatie met effecten op kolonie-niveau. Met de komst van de nieuwe datavereisten moet naar een acute, ook een chronische toxiciteitsstudie geleverd worden voor alle gewasbeschermingsmiddelen.

Uitgebreide samenvatting:

Adulte en larvale fruitvliegjes (*Drosophila melanogaster*) werden blootgesteld aan 3.1 mM (800 mg/L) imidacloprid in een sucroseoplossing. Ondanks deze hoge dosering was er slechts 31% mortaliteit na een acute blootstelling van 18 uur. Er was voldoende mortaliteit om een LC50 van ca. 1.4 mM (ca. 400 mg/L) te berekenen. De chronische LC50 werd berekend op basis van 8 dagen continue blootstelling aan dezelfde blootstellingsniveau's en bleek aanzienlijk lager te liggen maar nog steeds in de mg/L range (ca. 19 µM of 5 mg/L). De auteurs keken ook naar paring en vruchtbaarheid en vonden een verhoging van de paringsfrequentie bij 0.391 nM. Met betrekking tot de vruchtbaarheid werd geen dosis-reponse relatie gevondenDe studie levert geen echte nieuwe bruikbare informatie op inzake het werkingsmechanisme of de relatie met effecten op kolonie-niveau. Met de komst van de nieuwe datavereisten moet naast een acute, ook een chronische toxiciteitsstudie geleverd worden voor alle gewasbeschermingsmiddelen.

- *Effect van thiamethoxam op levensduur van honingbij* (Oliveira et al 2013)

Dit onderzoek toont aan dat de sterfte van geafrikaniseerde honingbijen in het lab toeneemt bij langere blootstellingsduur aan dezelfde concentratie. Dit benadrukt het belang van het meenemen van chronische toxiciteit, wat gaat gebeuren op basis van de nieuwe datavereisten en de nieuwe EFSA guidance.

Uitgebreide samenvatting:

In dit Braziliaanse onderzoek zijn honingbijen (*Apis mellifera meliifera x A.m. scutellata*, de 'geafrikaniseerde honingbij', 0-24 u oud) in het lab blootgesteld aan 0.428 ng thiamethoxam/µL/d of 0.0428 ng a.i./µL/d, 1/10 en 1/100 van de eerder in de studie bepaalde acute LD50. Bijen zaten in kooitjes in groepen van 25, met slechts eén groep per dosering. Bij 1/10 van de acute LD50 werd een 41.2% reductie van de levensduur gevonden (overleving was 8.04 d in de controle en bij 1/100 LD50, en 5.22 d bij 1/10 LD50). Bij dissectie werden bij 1/10 LD50 fysiologische verschillen gevonden in de hersenen en darm van de bijen. De gegeven doseringen per bij zijn niet geheel duidelijk aangezien de onderzoekers rapporteren in ng/µL/d. Volgens de onderzoekers konden de bijen elke dag 10 µL vloeistof opnemen, wat zou betekenen dat de verkorte levensduur en de fysiologische effecten optraden bij een dagelijkse dosis van 0.428 ng/bee/d. Het onderzoek wijst op het belang van het meenemen van chronische toxiciteit, wat gaat gebeuren op basis van de nieuwe datavereisten en EFSA guidance. De bevindingen over de fysiologische verschillen zijn momenteel niet te gebruiken in de risicobeoordeling vanwege het ontbreken van duidelijkheid over de relatie met populatie-effecten.

- *Effect van imidacloprid op gewicht van hommelvolken en productie van koninginnen* (Whitehorn *et al.* 2012)

Na twee weken continue blootstelling aan behandeld stuifmeel (6 of 12 ppb) en suikerwater (0.7 of 1.4 ppb) in het lab en daarna zes weken vrij foerageren in het veld waren hommelvolkjes lichter dan de controle en hadden ze veel minder koninginnen geproduceerd. In Nederland heeft imidacloprid als zaadbehandeling momenteel geen toelating in gewassen die aantrekkelijk zijn voor bijen. De geteste blootstellingsconcentraties zijn daarmee niet relevant voor de Nederlandse situatie. Bovendien is het gebruikte blootstellingsregime erg worst case en onrealistisch voor de praktijksituatie.

Uitgebreide samenvatting:

In deze test met imidacloprid en hommelvolken (*Bombus terrestris*) werd het effect onderzocht van twee verschillende concentraties imidacloprid in voedsel: een lage (stuifmeel 6 ug/kg, suikerwater 0.7 ug/kg) en een hoge (stuifmeel 12 ug/kg, suikerwater 1.4 ug/kg). Volken werden twee weken blootgesteld in het laboratorium en daarna zes weken in het veld gezet waar zij zelf naar believen konden foerageren. Dit onderzoek wordt gebruikt voor een voorgesteld testprotocol in de nieuwe EFSA guidance.
Bij beide doseringen zijn negatieve effecten gevonden op gewicht van het hommelvolk (8 en 12% voor de lage en hoge dosering) en op productie van koninginnen (2.0 en 1.4 koninginnen/volk in de lage en hoge dosering, versus 13.72 in de controle).
De gebruikte lage dosering bootst volgens het artikel 'field-realistic' concentraties na in nectar en pollen van gewassen die zaadbehandeling hebben gehad met imidacloprid (met name koolzaad). In Nederland heeft imidacloprid als zaadbehandeling momenteel echter geen toelating in gewassen die aantrekkelijk zijn voor bijen. De geteste blootstellingsconcentraties zijn dus minder relevant voor de Nederlandse situatie. Bovendien is het gebruikte blootstellingsregime, waarbij 100% van het voedsel van het gehele volk imidacloprid bevat gedurende twee weken, erg worst case en onrealistisch voor de praktijksituatie, waarin foerageersters waarschijnlijk verschillende voedselbronnen zullen gebruiken. Controlevolken kregen onbehandeld stuifmeel en nectar (dus geen suikerwater) waardoor de controle niet volledig te vergelijken is met de testgroepen. Het is interessant dat er duidelijke effecten waren van beide testconcentraties, maar geen echte dosis-response relatie.

- *Effect van imidacloprid en clothianidin op overleving van de koningin en werkster-activiteit in hommelvolken.* (Scholer and Krischik 2014)
  De auteurs concluderen dat negatieve effecten op hommels te verwachten zijn bij chronische blootstelling aan neonicotinoiden vanaf 20 ppb in het lab. Dit onderzoek is weinig realistisch wat betreft de blootstellingsduur (elf weken onafgebroken verontreinigd voedsel) en ook wat betreft de hoogte van veel van de testconcentraties, aangezien in Nederland toepassingen van imidacloprid en clothianidin in bloeiende gewassen momenteel niet zijn toegestaan.

Uitgebreide samenvatting:
In dit onderzoek werden hommelvolken (*Bombus impatiens*, 8 volken per testgroep, 9 in de controle) 11 weken blootgesteld in het laboratorium aan suikersiroop dat imidacloprid of clothianidin bevatte in concentraties van ca. 10, 20, 50 of 100 ppb.
Sterfte van de koningin was na zes weken verhoogd bij 50 en 100 ppb en na 11 weken bij 20, 50 en 100 ppb. Er werd geen effect gevonden op beweging van de koningin. De meeste hommelwerksters echter verzamelden geen voedsel meer, maar zaten uitgeblust wekenlang bij de feeder (het is onduidelijk of dit ook in de controle voorkwam). Er was een statistisch significant effect op werksterbeweging bij 20 en 50 ppb (bij 100 ppb bewogen er zo weinig hommels dat analyse niet mogelijk was). Er was ook een significant effect op de suikersiroopconsumptie van het volk: hoe hoger de dosis, hoe minder siroop opgenomen werd in het nest. Ook werden dan minder potten gemaakt. Gewicht van het nest was significant lager bij 10-100 ppb imidacloprid en bij 20-100 ppb clothianidin. Dit werd gemeten na 11 weken óf wanneer de koningin stierf, dus volken waar de koningin vroeg stierf hadden ook minder tijd om voedsel te verzamelen en te groeien. Volkgewicht en koninginsterfte zijn daarom gelinkte parameters. Er was geen specifiek effect op broed, aangezien er overal evenveel dood broed gevonden werd. De hoeveelheid levend broed was wel duidelijk verlaagd in de testgroepen, wat uiteraard ook gelinkt is aan de overleving van de koningin.
De opgeslagen siroop in het nest bevatte veel minder a.s. dan de aangeboden oplossing.
De auteurs concluderen dat negatieve effecten op hommels te verwachten zijn bij chronische blootstelling aan neonicotinoiden vanaf 20 ppb. Ook dit onderzoek is worst case wat betreft de blootstellingsduur (elf weken onafgebroken verontreinigd voedsel) en ook wat betreft de hoogte van veel van de testconcentraties, aangezien in Nederland toepassingen in bloeiende gewassen momenteel niet zijn toegestaan. Verder is dit een onderzoek in laboratoriumsetting en zouden deze effecten op veldniveau onderzocht moeten worden.

- *Effect van imidacloprid op vruchtbaarheid van hommelvolken* (Laycock et al 2012)
  Hier wordt een duidelijke afname van broedproductie van werksters gesignaleerd bij 13 dagen blootstelling aan imidacloprid, met een vermindering van één-derde bij 0.8 ppb, gekoppeld aan een afname in voedselopname. De auteurs concluderen dat voor het werkelijk begrijpen van de effecten op fertiliteit het nodig is om de dieetinvloeden te onderzoeken op koninginnen in plaats van op werksters. Ook stellen zij dat het nodig is de herstelmogelijkheid te onderzoeken van hommels, na de massale bloei van een neonicotinoide-zaadbehandeld gewas zoals koolzaad.

Uitgebreide samenvatting:

Microcolonies van 4 of 5 hommelwerksters *(Bombus terrestris)* zonder koningin werden in het laboratorium 13 dagen gevoerd met siroop met 125, 50, 20, 8, 3.2, 1.28, 0.51, 0.20, 0.08 en 0 microgram/L imidacloprid, plus onbehandeld pollen. Er trad vrijwel geen sterfte op bij de werksters. Wel werden negatieve effecten op vruchtbaarheid van de werksters gevonden met een duidelijke dosis-respons relatie, waaruit de auteurs afleidden dat een concentratie rond de 1 ppb (0.8 ppb obv erratum) broedproductie met één derde kan verminderen. Zij namen echter ook een significante reductie waar in het foerageren op siroop en pollen. Bovendien werd gevonden dat de kolonies die meer siroop en pollen consumeerden, meer broed produceerden. De auteurs wierpen vervolgens de hypothese op dat de reden voor de nadelige effecten op broedproductie te maken had met voedsellimitatie, veroorzaakt door het onvermogen zich te voeden. Zij concludeerden dat voor het werkelijk begrijpen van de effecten op fertiliteit het nodig is om de dieetinvloeden te onderzoeken op koninginnen in plaats van op werksters. Ook stelden zij dat het nodig is de herstelmogelijkheid te onderzoeken van hommels, na de massale bloei van een neonicotinoide-zaadbehandeld gewas zoals koolzaad. [Zie Laycock & Cresswell (2013), waarin deze zaken onderzocht zijn]

- *Effect van imidacloprid op vruchtbaarheid van hommelvolken (Laycock & Cresswell 2013). (deze studie is niet opgenomen in het EASAC-rapport. Er blijkt uit dat hommels herstelcapaciteit hebben)*
  Voortzetting van het onderzoek van Laycock et al. 2012. Labstudie met pulsdosering ter simulatie van bloei van koolzaad. Tijdens de 14-d blootstellingsperiode werd een duidelijke dosis-response relatie gevonden: hoe hoger de dosering, hoe minder broed werd geproduceerd. Herstel trad op in de tweede helft van de test, met 14-d onbehandelde siroop. De auteurs concluderen dat er mogelijk effecten optreden op de grootte en fitness van hommelvolken bij een gepulseerde blootstelling aan imidacloprid van meer dan 10 ppb. Blootstelling aan imidacloprid leidt blijkbaar tot een algehele vermindering van eetlust of capaciteit om te eten.
  De auteurs zeggen dat andere parameters dan broedproductie mogelijk minder makkelijk herstellen (zoals de productie van koninginnen, de parameter die in Whitehorn et al. (2012) een groot effect liet zien) en zouden graag meer onderzoek naar de herstelcapaciteit van deze andere parameters zien.
  Dit onderzoek is zeer interessant aangezien het een gepulseerde blootstelling nabootst, relevant voor een kort bloeiend aantrekkelijk gewas. Aangezien in Nederland toepassingen van imidacloprid in bloeiende gewassen momenteel niet zijn toegestaan, heeft het geen consequenties voor de huidige toelatingen.

Uitgebreide samenvatting:
Microkolonies (één koningin en vier werksters) van *Bombus terrestris* L. werden in het laboratorium 14 dagen gevoerd met siroop met 125, 0, 20, 8, 3.2, 1.28, 0.51, 0.2, 0.08 en 0 ug/L imidacloprid (ca. 100, 40, 16, 6, 2.5, 1, 0.4, 0.16, 0.06 en 0 ppb), plus onbehandeld pollen. Daarna werden ze 14 dagen gevoerd met onbehandelde siroop om de herstelcapaciteit te testen na zo'n gepulseerde dosering, waarmee de massale bloei van een neonicotinoide-zaadbehandeld gewas zoals koolzaad wordt nagebootst. Er waren drie volken per behandeling. Het experiment is twee keer uitgevoerd, wat leidt tot in totaal zes volken per dosering.
Er trad geen sterfte op bij de koninginnen en nauwelijks bij de werksters. Tijdens de 14-d blootstellingsperiode werd een duidelijke dosis-response relatie gevonden: hoe hoger de dosering, hoe minder broed werd geproduceerd. Er werden een EC50 en EC10 van 1.44 en 0.15 ppb afgeleid voor broedproductie. Tijdens de 14-d herstelperiode werd dosis-gerelateerd herstel waargenomen. Herstel was niet volledig bij hogere concentraties. Voor de totale 28-d periode worden een EC50 en EC10 van >98 en 2.5 ppb afgeleid.
De auteurs berekenen dat 14 dagen blootstelling aan 0.3-10 ppb imidacloprid broedproductie kan verminderen met 18-84%, maar dat de herstelcapaciteit bij deze concentraties zo groot is dat twee weken onbehandeld voedsel na de blootstellingsperiode ervoor zorgt dat de reductie in broed zakt naar 2-19%.
Er werd ook een experiment uitgevoerd waarin volken vier weken lang met 0 (7 volken) of 100 (5 volken) ppb gevoerd werden. Hiermee werd bepaald dat het herstel in broedproductie hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt werd door het wegnemen van de imidacloprid en niet door gewenning aan langdurige blootstelling.
Tijdens de blootstellingsperiode was er geen effect op de timing van de eerste eileg, maar in de herstelperiode werd de eileg vertraagd bij volken die een hogere dosering hadden gehad.
Tijdens de blootstellingsperiode was er een dosisgerelateerde reductie in de consumptie van siroop en pollen (siroop EC50/EC10 >98 / 23.6 ppb, pollen EC50/EC10 4.4 / 0.2 ppb). Tijdens de 14-d herstelperiode werd dosis-gerelateerd herstel waargenomen. Herstel was niet volledig. Voor de totale 28-

d periode worden een EC50 / EC10 van 43.7 / 16.2 ppb afgeleid voor reductie in pollenconsumptie en een EC50 en EC10 van >98 en 32.4 ppb voor reductie in siroopconsumptie.
Aangezien er herstelcapaciteit is voor effecten op broedproductie, maar deze bij hogere dosering niet volledig is, en er bij hogere dosering bovendien een vertraging in de eileg optreedt in de herstelperiode, concluderen de auteurs dat er mogelijk effecten optreden op de grootte en fitness van hommelvolken bij een gepulseerde blootstelling aan imidacloprid bij meer dan 10 ppb.
Blootstelling aan imidacloprid leidt blijkbaar tot een algehele vermindering van eetlust of capaciteit om te eten, aangezien zowel pollen- als siroopconsumptie gereduceerd werd maar alleen de siroop behandeld was. De hypothese van Laycock et al. (2012) was dat reductie in broedproductie werd veroorzaakt door een gebrek aan nutrienten. Deze hypothese wordt ondersteund door dit onderzoek, aangezien 1) volken die meer siroop en pollen aten, ook meer broed produceerden, 2) reductie in voedselopname dosisgerelateerd was, 3) reductie van broedproductie samenviel met reductie in voedselopname, en 4) herstel van deze twee parameters ook tegelijkertijd optrad toen de imidaclopridblootstelling weggenomen was.
De auteurs zeggen dat andere parameters dan broedproductie mogelijk minder makkelijk herstellen (zoals de productie van koninginnen, de parameter die in Whitehorn et al. (2012) een groot effect liet zien) en zouden graag meer onderzoek naar de herstelcapaciteit van deze andere parameters zien.
Het is opvallend dat deze studie niet in het EASAC-rapport opgenomen is. Er blijkt uit dat hommels herstelcapaciteit hebben.

- *Effect van thiamethoxam op vruchtbaarheid van hommelvolken* (Laycock et al 2013)
  Net als in Laycock et al. 2012 met imidacloprid wordt een duidelijke afname van broedproductie van werksters gesignaleerd bij 17 dagen blootstelling aan thiamethoxam, maar pas bij hogere concentraties (vanaf 39 ppb). Verminderde broedproductie is ook hier gekoppeld aan een afname in voedselopname. Ook hier stellen de auteurs dat dit onderzoek herhaald moet worden met koninginnen om werkelijk iets te kunnen zeggen op effect op de broedproductie van hommelvolken.

Uitgebreide samenvatting:
Microcolonies van 4 hommelwerksters *(Bombus terrestris subsp. audax)* zonder koningin werden in het laboratorium 17 dagen gevoerd met fructose/glucose/saccharose-oplossing met 98.43, 39.37, 15.75, 6.30, 2.52, 1.01, 0.40, 0.16, 0.06 en 0 microgram/kg thiamethoxam, plus onbehandeld pollen (9 volkjes/concentratie, 9 in de controle). Er was een significante reductie in het foerageren op siroop en pollen en op de hoeveelheid geproduceerd broed bij 39 en 98 ppb. Net als voor imidacloprid in Laycock et al. 2012, werd een relatie gevonden tussen verminderde voedselopname en verminderde broedproductie. De levensduur van werksters was significant lager bij 98 ppb. De gevoeligheid van *Bombus terrestris* voor thiamethoxam lijkt lager dan die voor imidacloprid (vergelijk Laycock et al 2012) maar dit moet volgens de auteurs nog onderzocht worden met hommels van hetzelfde volk. Ook hier stellen de auteurs dat dit onderzoek herhaald moet worden met koninginnen om werkelijk iets te kunnen zeggen over het effect op de broedproductie van hommelvolken.

- *Effect van imidacloprid, thiamethoxam en thiacloprid op chronische mortaliteit en reproductie van hommels* (Mommaerts et al. 2010)
  Dit laboratoriumonderzoek laat zien dat de effecten op hommels groter zijn wanneer foerageeractiviteit van de hommels nodig is dan wanneer ze direct bij hun broed gevoerd worden. Hetzelfde resultaat werd gevonden toen de proef in een semi-veldopstelling (in de kas) werd herhaald. De auteurs pleiten er daarom voor dat een hommeltest in het laboratorium zoals door hen ontwikkeld, opgenomen wordt in de datavereisten. In het EFSA GD is een dergelijke test echter niet opgenomen; foerageeractiviteit zal alleen worden meegenomen in semi-veld en veldtesten. Verder leiden de auteurs op basis van al hun data een NOEC af van 2 ppb imidacloprid voor hommels, en concluderen zij dat thiamethoxam iets minder toxisch is dan imidacloprid en thiacloprid veel minder toxisch dan de andere twee. Dit onderzoek is relevant voor gebruik van neonicotinoïden in bloeiende gewassen, iets wat momenteel van de drie geteste stoffen alleen is toegestaan voor thiacloprid. Aangezien het onderzoek aantoont dat de risico's van thiacloprid lager zijn dan die van bijvoorbeeld imidacloprid, is acuut ingrijpen in de toelatingen van thiacloprid op dit moment niet nodig. Ctgb wacht hierin verdere ontwikkelingen in Europa af.

Uitgebreide samenvatting:
Dit onderzoek is uitgevoerd met kleine nesten hommels (*Bombus terrestris*, 5 werksters, geen koningin). Om de chronische mortaliteit en het effect op reproductie van drie neonicotinoiden te testen werden de volken elf weken gevoerd met behandeld suikerwater in een kunstnest in het laboratorium. In een ander laboratoriumexperiment werd ook foerageergedrag meegenomen. Daar werd elk volk in een kunstmatige neststructuur gezet waarbij twee nesten zijn verbonden met een buis van ca. 20 cm. In één nest wordt

het broed opgeslagen, in het andere wordt suikerwater en pollen aangeboden. Ook hier werd elf weken gevoerd. Naast mortaliteit en reproductieeffecten werd ook gedrag en opname van suikerwater geobserveerd. Suikerwater was onbehandeld, of bevatte 200, 20, 2, 0.2 ppm of 20 of 10 ppb imidacloprid. Per concentratie zijn vier volken gebruikt. Alle experimenten zijn een keer herhaald.
Bij de hoge concentraties imidacloprid werd 100% mortaliteit bereikt, maar wel in relatie met de blootstellingsduur: het duurde een paar uur, 14 d, 28 d of 49 d bij 200, 20, 2 en 0.2 ppm. Bij 20 en 10 ppb werd na elf weken continue blootstelling 15% en 0% mortaliteit gezien ten opzichte van de controle. Negatieve effecten op het aantal geproduceerde darren werden gezien bij de concentraties 200 tot 0.2 ppm, maar niet bij 20 en 10 ppb. In het experiment waar de hommels zich moesten verplaatsen tussen broed en voedsel werd hetzelfde patroon gezien, met het verschil dat het bij de middelste concentraties iets sneller ging voordat 100% mortaliteit bereikt werd (7 en 14 d bij 20 en 2 ppm) en dat bij 20 ppb 50% mortaliteit optrad na 11 weken (bij 10 ppb bleef het 0%).Ook de reproductie-effecten waren uitgesprokener.
Effectconcentraties van imidacloprid waren (in ppb):

- Foerageeractiviteit niet meegenomen: Mortaliteit LC50 59, NOEC 10. Reproductie EC50 67, NOEC 20.
- Foerageeractiviteit wel meegenomen: Mortaliteit 20, NOEC 10; subletaal 3.7, NOEC < 2.5.

Om de resultaten van de labexperimenten te bevestigen werd een kastest uitgevoerd, waar volken met koningin, 25 werksters en broed in met gaas afgesloten gedeeltes van een kas geplaatst werden. Suikerwater en pollen werden op een afstand van 3 m van het nest geplaatst. Suikerwater bevatte 20, 10, 2 of 0 ppb imidacloprid. Drie volken per concentratie, elk experiment éénmaal herhaald. Werkstermortaliteit, volkgewicht, broed en foerageeractiviteit werden twee weken gevolgd. Bij 20 en 10 ppb stierven 62 en 92% van de werksters en alle nog levende werksters waren apatisch. Bij 20 ppb lagen alle dode werksters bij het voer, bij 10 ppb lagen ze in het nest, wat aanduidt dat ze bij 10 ppb nog terug naar het nest konden vliegen. Bij 2 ppb was er geen mortaliteit en waren er ook geen subletale effecten op het volk, het broed of het foerageergedrag van werksters.
De labexperimenten zijn ook uitgevoerd met twee andere neonicotinoïden: 100, 10, 1, 0.5, 0.2, 0.1 ppm en 10 ppb thiamethoxam (alleen 0.1 ppm in het foerageerexperiment); en 120, 60, 12, 1.2, 0.12 ppm en 12 ppb thiacloprid (alleen 12 ppm in het foerageerexperiment). Op deze resultaten gaan de auteurs minder diep in, ze concluderen vooral dat thiamethoxam iets minder toxisch is dan imidacloprid en thiaclopid veel minder toxisch dan de andere twee.
Dit onderzoek laat zien dat de effecten op hommels groter zijn wanneer foerageeractiviteit van de hommels nodig is (via de 20 cm lange buis) dan wanneer ze direct bij hun broed gevoerd worden. De auteurs pleiten er daarom voor dat een hommeltest in het laboratorium zoals door hen ontwikkeld, opgenomen wordt in de datavereisten. In het EFSA GD is een dergelijke test echter niet opgenomen; foerageeractiviteit zal alleen worden meegenomen in semi-veld en veldtesten. Verder leiden de auteurs op basis van al hun data een NOEC af van 2 ppb imidacloprid voor hommels.

- *Effect van imidacloprid op voedselopname, bewegingsactiviteit en levensduur van hommels en honingbijen* (Cresswell et al. 2012)
  Binnen deze laboratoriumstudie werden effecten gevonden op voedselopnamesnelheid en bewegingsactiviteit van hommels na blootstelling aan imidacloprid gedurende het hele experiment (ca.35 d voor hommels, ca.6 d voor honingbijen). De levensduur van hommels werd niet beïnvloed door imidacloprid. Bij honingbijen was er geen effect van de blootstelling op alledrie de parameters, ondanks dat de opgenomen hoeveelheid per dag ongeveer overeenkomt met de acuut orale LD50 van ~4 ng/bij/dag. Dit wordt verklaard met het feit dat de honingbijen in dit onderzoek hun dagelijkse dosis over 24 uur opnamen, in plaats van in zes uur zoals in de acuut orale test. Blijkbaar zorgt metabolisering gedurende de dag ervoor dat er geen toxische dosis in het lichaam wordt bereikt. Bij hommels waren er al effecten bij >1 ng/bij/d.
  De auteurs vonden 10-30% reductie in voedselopnamesnelheid van hommels bij concentraties tussen 1 en 10 µg/L, wat veldrealistische concentraties zijn voor bloeiende gewassen die zaadbehandeling met imidacloprid hebben gehad. Of dit effect ook optreedt in het veld en wat het effect is op volk- en populatieniveau moet verder onderzocht worden. Zaadbehandeling in bloeiend gewas is momenteel niet toegelaten in Nederland.

Uitgebreide samenvatting:
Laboratoriumstudie waarin honingbijen (*Apis mellifera,* Buckfast) en hommels (*Bombus terrestris* L.) blootgesteld werden aan imidacloprid in siroop. Hommels werden individueel blootgesteld, honingbijen in groepjes van tien, voor zo lang als ze in leven bleven. Dosering: 125, 50, 20, 8, 3.2, 1.28, 0.51, 0.20, 0.08 en 0 µg/L imidacloprid. Testen werden twee maal uitgevoerd: met en zonder acetonitrile als oplosmiddel (in concentratie 100 µL/µg imidacloprid). Bovendien werd een controle uitgevoerd met acetonitrile in 'een

geschikte dosisgradiënt'. Snelheid van voedselopname, bewegingsactiviteit en levensduur werden gemeten.
Bij hommels is gecorrigeerd voor de grote verschillen in voedselopnamesnelheid tussen individuen, die waarschijnlijk veroorzaakt werden door verschillen in grootte en leeftijd. Ook is gecorrigeerd voor het effect van acetonitrile op bewegingsactiviteit van hommels, het enige effect van het oplosmiddel dat in de controle gevonden werd.
De gemiddelde voedselopnamesnelheid van hommels nam significant af met toenemende imidaclopriddosis. De gemiddelde bewegingssnelheid van hommels nam significant af met toenemende imidaclopriddosis, maar alleen als acetonitrile ook in de oplossing zat. Hommels leefden langer dan honingbijen (ca. 35 d vs. ca. 6 d) en hun levensduur werd niet beïnvloed door imidacloprid. In een apart experiment is onderzocht of het effect op hommels op voedselopnamesnelheid sterker werd in de tijd. Dit bleek inderdaad zo te zijn. In aanwezigheid van acetonitrile trad het effect sneller op dan zonder oplosmiddel.
De auteurs stellen dat imidacloprid een toxisch effect had op hommels en niet alleen een vermijdingseffect. De voedselopnamesnelheid van hommels nam snel af boven doseringen van 1,28 µg/L (1.0 µg/kg), wat overeenkwam met een dagelijkse dosis van >1 ng/bij. Levensduur was niet aangetast, in tegenstelling tot wat Mommaerts et al. (2010) vonden in een kooiexperiment (zie elders in dit document), maar dit kan verklaard worden door het feit dat de hommels in het onderzoek van Cresswell et al. 2012 geen afstand hoefden af te leggen van en naar hun voedsel.
De dosis-respons curve van de reductie van voedselopnamesnelheid had twee pieken. De auteurs speculeren dat lage doseringen toxisch zijn omdat ze onder de drempel voor detoxificatie liggen. Als die drempel bereikt wordt, bij hogere dosering, keert de opnamesnelheid terug naar het normale niveau, maar bij nog hogere doseringen kan er niet genoeg afgebroken worden en wordt de stof opnieuw toxisch. In aanwezigheid van acetonitrile had imidacloprid een extra schadelijk effect, waarschijnlijk omdat deze stof de membraanpermeabiliteit van cellen voor imidacloprid vergroot. Acetonitrile zit normaal gesproken niet in gewasbeschermingsmiddelen en dit is dus geen veldrelevant effect.
Bij honingbijen was er geen effect van de behandelingen op alle drie de parameters. De dagelijkse dosis was in de hoogste dosering ongeveer 4.9 ng/bij/dag, een dosis die ongeveer gelijk is aan de LD50. In deze studie is waarschijnlijk geen schadelijk effect gevonden omdat de bijen deze dosis gedurende 24 uur per dag konden opnemen in plaats van gedurende zes uur in de acute toxiciteitsstudie, en dus de stof ook 24 uur per dag konden metaboliseren zodat er geen dodelijke dosis in het lichaam bereikt werd. Dit betekent dat honingbijen imidacloprid goed onschadelijk kunnen maken in hun lichaam. Andere studies vonden schadelijke effecten bij doseringen die veel lager lagen dan in deze studie. De auteurs geven drie mogelijke redenen hiervoor: 1) de onderzochte parameters zijn minder gevoelig dan die van de andere studies (de PERtest – proboscis extension reflex); 2) de behandeling van de bijen was zachter dan bij een PERtest, waar bijen gekoeld moeten worden en in een harnas vastzitten tijdens de test, waardoor hun detoxicificatiesysteem mogelijk minder goed werkt; 3) de bijen kwamen van een ongevoelig volk, maar andere onderzoekers hebben de PERtest uitgevoerd met bijen van hetzelfde volk en vonden een even grote gevoeligheid als in andere studies, dus dit is niet waarschijnlijk.
De auteurs verklaren het verschil in gevoeligheid bij orale blootstelling tussen honingbijen en hommels met de hypothese dat honingbijen evolutionair meer gewend zijn aan giftige alkaloiden in tropische nectar en daardoor imidacloprid beter kunnen metaboliseren. Hier is echter meer onderzoek naar nodig.
De auteurs vonden in hun laboratoriumstudie 10-30% reductie in voedselopnamesnelheid van hommels bij concentraties tussen 1 en 10 µg/L imidacloprid, wat veldrealistische concentraties zijn voor bloeiende gewassen die zaadbehandeling hebben gehad. Of dit effect ook optreedt in het veld en wat het effect is op volk- en populatieniveau moet verder onderzocht worden.

- *Effect van imidacloprid op voedselopname, bewegingsactiviteit en levensduur van hommels en honingbijen. Cresswell et al. 2013 (NB per abuis aangehaald door EASAC als 2014)*
  Net als in Laycock & Cresswell 2013 werd ook in dit laboratoriumexperiment een (pulsdosering) getest. Bij honingbijen was er geen effect op voedselopname en activiteit. Op basis van residumetingen berekenen de auteurs dat de honingbijen alle dagelijks opgenomen imidacloprid weer gedurende die dag konden afbreken.
  Hommels namen ongeveer drie maal zoveel meer imidacloprid op dan honingbijen (waarom is niet bekend). 8 dagen lang behandelde hommels konden het residue vanaf dag vier niet meer volledig afbreken. Bij de pulsdoseringsgroep verdween het residu in de hommel na twee dagen. De behandelde groepen hommels hadden een significant lagere voedselopname en lichaamsactiviteit. In de pulsdoseringsgroep leek zich dit te herstellen nadat de blootstelling gestopt was.

De auteurs concluderen dat in de risicobeoordeling de volledige dagelijke dosis niet in één enkele maaltijd gegeven zou moeten worden. Die situatie houdt geen rekening met de metabolisering in het lichaam die op zal treden bij opname van de dagelijkse dosis in vele maaltijden, wat voor bijen een meer realistische situatie is. In de huidige en nieuwe guidance wordt in de hogere tier de realistische blootstellingssituatie meegenomen.

Uitgebreide samenvatting:
Volwassen werksterbijen (Apis mellifera en Bombus terrestris) werden in het lab blootgesteld aan 98 ug/kg = 125 ug/L siroop (zie Cresswell et al 2012 Differential sensitivity voor samenstelling siroop). Honingbijen zaten in kooitjes met tien individuen, hommels zaten alleen. Testgroepen kregen 8 dagen lang behandelde of onbehandelde siroop, of drie dagen behandelde en daarna vijf dagen onbehandelde siroop (pulsdosering) (30 honingbijen en 33 hommels per groep).
Bij honingbijen was er geen effect op voedselopname en activiteit. Hoewel 8-dgn behandelde bijen 2.2 ng/dag imidacloprid opnamen, was het residugehalte in hun lichaam niet te onderscheiden van onbehandelde bijen. De auteurs berekenen daarom een daily clearance rate (C) van ~100%. Dit bevestigt een eerder gevonden halfwaardetijd in de honingbij van ~4 uur.
Bij 8-dgn behandelde hommels was het residugehalte in het lichaam vanaf dag vier wel significant hoger dan bij onbehandelde bijen. Zij namen gemiddeld 6.7 ng/d op. C was 88% op de eerste dag en ~68% daarna. Bij de pulsdoseringsgroep verdween het residu in de hommel binnen 48 uur na blootstelling (met halfwaardetijd 10.3 uur). De behandelde groep had een significant lagere voedselopname en lichaamsactiviteit. In de pulsdoseringsgroep leek zich dit te herstellen nadat de blootstelling gestopt was.
Dit onderzoek bouwt voort op Cresswell et al (2012), waarin dezelfde verschillen in effect op voedselopname en activiteit tussen honingbijen en hommels werden gevonden bij ~100 ppb. De verklaring hiervoor wordt gezocht in een verschil in vermogen om imidacloprid in het lichaam af te breken of uit te stoten. Hommels namen echter in beide onderzoeken ook ongeveer drie keer zoveel (siroop en dus) imidacloprid op, dus de verklaring kan ook liggen in het feit dat hommels gewoon meer imidacloprid in hun lichaam hadden en dat niet allemaal af konden breken. Waarom hommels zoveel meer aten dan honingbijen is niet bekend en kan in ieder geval niet verklaard worden met lichaamsgewicht alleen. De auteurs speculeren dat de hommels meer siroop opnamen omdat zij meer energie nodig hadden om hun lichaam op temperatuur te houden.
De auteurs concluderen dat in de risicobeoordeling de volledige dagelijke dosis niet in één enkele maaltijd gegeven zou moeten worden. Die situatie houdt geen rekening met de metabolisering in het lichaam die op zal treden bij opname van de dagelijkse dosis in vele maaltijden, wat een meer realistische situatie is.
De auteurs stellen ook dat hun onderzoek aantoont dat imidacloprid niet irreversibel gebonden wordt in insecten. Effecten op hommels worden in ander onderzoek gevonden bij veel lagere concentraties dan in dit onderzoek (bij ca. 1 ng/d). De auteurs kunnen dit niet goed verklaren aangezien in het huidige onderzoek hommels 5 ng/d kunnen afbreken. Blijkbaar is de afbreekcapaciteit van hommels altijd incompleet, onafhankelijk van de dosering.

- *Effect van imidacloprid op de ontwikkeling van de hypopharyngeale klier (HPG) en ademhalingsfrequentie van honingbijen* (Hatjina et al. 2013)
  Deze studie vond een effect op de HPG en ademhalingsfrequentie van honingbijen. De bestudering van deze effecten op de HPG is nieuw (effecten zijn weinig onderzocht) en onduidelijk is hoe dit te gebruiken in de risicobeoordeling.

Uitgebreide samenvatting:
Deze studie kijkt naar de effecten op bijen (*Apis mellifera)* van 2-3 ppb imidacloprid (in pollen en suikerwater) op de ontwikkeling van de hypopharyngeale klier (HPG) en ademhalingsfrequentie van honingbijen. De acini (onderdelen van deze klier) zijn max. 16.3% kleiner in behandelde bijen, de ademhaling is vertraagd. De bestudering van effecten op de HPG en ademhaling is relatief nieuw (effecten zijn weinig onderzocht) en onduidelijk is hoe dit te gebruiken in de risicobeoordeling; er is nog geen link te leggen met populatie-effecten.

- *Effect van thiamethoxam op nestterugvindcapaciteit van honingbijen* (Henry et al. 2012)
  Uit de test blijkt dat honingbijen die aan 67 ppb thiamethoxam blootgesteld waren, hun nest minder goed konden terugvinden dan controlebijen. Na modellering verwachten de auteurs dat er ook effecten op volkniveau zullen zijn. Het artikel leidde tot flinke wetenschappelijke discussie. De

auteurs gaven daarin zelf later[6] toe dat ' substantial improvement is needed before one could use honey bee colony modeling in its current form for risk assessment'. Als er inderdaad substantieel verstorende effecten optreden op foerageersters, zou dat te zien moet zijn aan parameters op volkniveau (zie ook de beschermdoelen in de nieuwe EFSA guidance). Dit is uit deze test niet af te leiden. De in de test gebruikte dosering is bovendien aanzienlijk hoger dan de veldrealistische concentratie, zeker aangezien toepassing van thiamethoxam in bloeiende gewassen niet is toegestaan.

Uitgebreide samenvatting:
Ervaren honingbijfoerageersters werden bij de kast gevangen, getagged met een chip en gevoerd met thiamethoxam in suikeroplossing (1.34 ng/bee, 67 ppb). Daarna werden ze losgelaten op een hen bekende of onbekende plek tot op 1 km van het nest. Uit de test bleek dat honingbijen die aan thiamethoxam blootgesteld waren, hun nest minder goed konden terugvinden dan controlebijen. De bekende terugvliegroute ging na blootstelling aan thiamethoxam makkelijker dan de onbekende. Na modellering van hun resultaten met een model van Khoury verwachten de auteurs dat er ook effecten op volkniveau zullen zijn. Het artikel leidde tot flinke wetenschappelijke discussie. De auteurs gaven daarin zelf later[6] toe dat ' substantial improvement is needed before one could use honey bee colony modeling in its current form for risk assessment'. Het is de verwachting dat als er inderdaad substantieel verstorende effecten optreden op foerageersters, dat dan te zien moet zijn op volkniveau (zie ook de beschermdoelen in de nieuwe EFSA guidance). Dit is uit deze test niet af te leiden. De in de test gebruikte dosering is bovendien aanzienlijk hoger dan de veldrealistische concentratie, zeker aangezien toepassing van thiamethoxam in bloeiende gewassen niet is toegestaan.

- *Effect van imidacloprid op de tijdsperiode tussen voedselvergaarmomenten van honingbijen (Yang et al. 2008)*
  Bij 40 ppb werd geen effect gezien, maar vanaf 50 ppb imidacloprid was de terugkeertijd bij de voedselbron significant verhoogd en vanaf 1200 ppb kwam een deel van de bijen helemaal niet meer terug. Deze effectconcentraties zijn veel hoger dan schadelijke concentraties uit andere studies (daarin worden vanaf 20 ppb al subletale effecten gezien). De relevantie van dit effect op kolonieniveau dient in semi-veld of veldtesten onderzocht te worden.

Uitgebreide samenvatting:
In deze Taiwanese test zijn met kleur gemarkeerde getrainde foerageersters (*Apis mellifera)* gevolgd op een *feeding station*. Tijdsperiode tussen *feeding bouts* (voedselvergaarmomenten) is gemarkeerd. Verschillende concentraties imidacloprid in 50% suikeroplossing worden gebruikt (40-6000 µg/L). Oplosmiddel is DMSO omdat van aceton ook al een klein effect gevonden wordt. 'Behavioral abnormality' wordt hier gedefinieerd als 'met periode tussen bouts > 300 s'. Zonder imidacloprid kwamen alle bijen binnen 300s terug, mét werd de periode langer. Hoe hoger de concentratie, hoe sneller het effect optrad en hoe groter het percentage beïnvloede bijen. De laagste concentratie met effect op terugkeertijd was ~50 ppb (50 µg/L, 1.82-4.33 ng/bee, wat ongeveer gelijk is aan de LD50 uit de LoEP van 3.7 ng/bee). Vanaf 1200 µg/L begonnen de problemen met vermiste bijen: ze kwamen niet allemaal meer terug. Sommige nooit, sommige pas de volgende dag, en ook toen lieten ze nog terugkeertijden > 300 s zien. Het is opvallend dat in andere onderzoeken al vanaf 20 ppb subletale effecten aangetoond zijn. Hier is getest van 40 - 6000 µg/L en bij 40 µg/L waren geen effecten te zien. De relevantie van dit effect op kolonieniveau dient in semi-veld of veldtesten onderzocht te worden.

- *Easton en Goulson 2013*

Dit artikel gaat over bestuivende vliegen en kevers en is daarom niet in dit hoofdstukje over bijen samengevat.

- *Effect van imidacloprid met of zonder lambda-cyhalothrin op hommelvolken (Gill et al. 2012)*
  Hommelvolken werden vier weken blootgesteld in het lab aan behandelde suikersiroop (10 ppb imidacloprid) en/of aan contactblootstelling aan lambda-cyhalothrin en konden buiten foerageren voor stuifmeel. In alle behandelde groepen zijn er minder werksters, het minst in de combinatiegroep. Dit onderzoek lijkt enigszins op een voorgesteld testprotocol in de nieuwe EFSA guidance. De gevonden effecten op hommels benadrukken de noodzaak hommels zo snel mogelijk op te nemen in het toetsingskader. Ook zeer relevant is de bevinding dat de effecten sterker zijn bij een combinatie van twee bestrijdingsmiddelen. Zie elders voor de aanbeveling zo

[6] Henry, Beguin, Requier, Rollin, Jean-Odoux, Aupinel, Aptel, Tchamitchian, Decourtye. Response to comment on ""A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees". Science 337 21/09/2012. 10.1126/science.1224930

snel mogelijk toetsingskader te ontwikkelen voor het beoordelen van combinatietoxiciteit van het gebruik van meerdere middelen in een seizoen op hetzelfde gewas. De gebruikte dosering van imidacloprid is echter niet relevant voor de huidige toelatingssituatie, waarin toepassing in bloeiende gewassen niet is toegestaan.

Uitgebreide samenvatting:
Tien hommelvolken (*Bombus terrestris*, een koningin plus maximaal 10 werksters) per groep werden getest in het laboratorium: controle, 10 ppb imidacloprid in suikeroplossing (nabootsing van zaadbehandeling van bloeiend gewas), lambda-cyhalothrin met 37.5 ppm op filterpapier bij de feeder (nabootsing van spuitbehandeling, wekelijks hernieuwd), en combinatie van de twee a.s. De imidaclopridoplossing werd vlak naast het broed aangeboden, in de kast. De hommels konden buiten foerageren (dit was nodig om stuifmeel te verzamelen). De blootstelling duurde vier weken. In de lambda-cyhalothrin- en mixgroepen zijn er meer dode werksters. In de imidacloprid- en combinatiegroepen komen minder werkers uit. De hypothese van de auteurs is dat dit komt door voedselgebrek. Er zijn meer foerageersters maar die halen minder efficient pollen van buiten. Uiteindelijk zijn in alle behandelde groepen minder werksters, en het minst in de combinatiegroep.
Dit onderzoek wordt gebruikt voor een voorgesteld testprotocol in de nieuwe EFSA guidance (voor wat betreft de blootstelling aan imidacloprid). De bevinding dat de effecten sterker zijn bij een combinatie van twee bestrijdingsmiddelen is relevant en zou onderzocht moeten worden in een meer realistische setting. Zie elders voor de aanbeveling zo snel mogelijk toetsingskader te ontwikkelen voor het beoordelen van combinatietoxiciteit van het gebruik van meerdere middelen in een seizoen op hetzelfde gewas. De gebruikte dosering van imidacloprid is echter niet relevant voor de huidige toelatingssituatie, waar toepassing in bloeiende gewassen niet is toegestaan.

- *Effect van imidacloprid, clothianidin of coumaphos op hersenactiviteit van honingbijen* (Palmer et al. 2013)
  De activiteit van 'mushroom body Kenyon Cells' in geïsoleerde honingbijhersenen werd in het lab gemeten bij blootstelling aan imidacloprid, clothianidin of het Varroamijtenbestrijdingsmiddel coumaphos in het medium waarin het brein gehouden werd. De auteurs vinden een bij de drie stoffen vergelijkbaar neurofysiologisch effect.
  In het artikel worden concentraties gebruikt die volgens de auteurs in behandeld bloeiend gewas en in bijenkasten kunnen worden aangetroffen. Of deze concentraties dan ook relevant zijn voor directe stimulatie van een brein is niet bekend. Het betreft een labstudie naar een neuronaal mechanisme, wat interessant is voor het begrijpen van een effect, maar minder relevant voor gebruik in een risicobeoordeling. Te verwachten effecten op basis van dit soort studies moeten in veldstudies onderzocht worden. Derhalve maakt dit artikel ingrijpen in de huidige Nederlandse toelatingssituatie niet noodzakelijk

Uitgebreide samenvatting:
Labonderzoek naar de activiteit van 'mushroom body Kenyon Cells' in geïsoleerde honingbijhersenen, bij blootstelling aan imidacloprid, clothianidin of het Varroamijtenbestrijdingsmiddel coumaphos. De 'mushroom bodies' zijn hersenstructuren die zintuiginformatie integreren en een functie hebben bij leergedrag en geheugen. Blootstelling van de geïsoleerde breinen gaat via de vloeistof waarin de breinen gehouden worden. De auteurs vinden een bij de drie stoffen vergelijkbaar neurofysiologisch effect. Hieruit concluderen zij dat dit mogelijk het mechanisme is dat de in sommige studies gevonden door neonicotinoïden veroorzaakte cognitieve verslechtering bij honingbijen. Verder voorspellen zij dat gelijktijdige blootstelling aan verschillende stoffen die op de cholinergische impulsoverdracht werken, toxiciteit voor bestuivers zal vergroten.
In het artikel worden concentraties gebruikt die volgens de auteurs in behandeld bloeiend gewas en in bijenkasten kunnen worden aangetroffen. Of deze concentraties dan ook relevant zijn voor directe stimulatie van een brein is niet bekend. Het betreft een labstudie naar een neuronaal mechanisme, wat interessant is voor het begrijpen van een effect, maar minder relevant voor gebruik in een risicobeoordeling. Te verwachten effecten op basis van dit soort studies moeten in veldstudies onderzocht worden. Derhalve maakt dit artikel ingrijpen in de huidige Nederlandse toelatingssituatie niet noodzakelijk.

- *Effect van imidacloprid op ontwikkeling, hersenstructuur en loopgedrag van een tropische angelloze bij (Tomé et al. 2012)*
  Larven van een tropische angelloze bij werden gedurende hun hele ontwikkeling via hun voedsel blootgesteld aan imidacloprid, in 18 verschillende concentraties. Er was geen effect op ontwikkelingstijd en voedselopname van de larven, wel op sterfte, hersenstructuur en loopgedrag van adulten.

Deze bijensoort komt (net als alle angelloze bijen) niet voor in Europa en wat dat betreft is dit onderzoek dus minder relevant voor de Europese of Nederlandse toelatingssituatie. Wel blijkt hieruit dat blootstelling tijdens de larvale periode ook nog effecten kan opleveren op adulten die direct na uitkomen nog niet te zien zijn. Effecten van blootstelling op bijenlarven zullen meegenomen worden met ingang van de nieuwe EFSA guidance. Het protocol van de test voor larvale blootstelling is momenteel in ontwikkeling bij de OECD. Ctgb is hierbij betrokken door het leveren van commentaar en heeft reeds het belang van het meenemen van het adulte stadium benadrukt.

Uitgebreide samenvatting:

Eieren uit nesten van de Braziliaanse angelloze bij *Melipona quadrifasciata anthidiodes* werden in kunstmatige cellen geplaatst in het laboratorium en gevoed met larvaal dieet dat uit hetzelfde volk kwam als de larve. Het dieet bevatte 0, 0.0056, 0.014, 0.028, 0.037, 0.051, 0.056, 0.08, 0.112, 0.28, 0.37, 0.56, 1.12, 1.75, 3.50, 7.00, 14.00, 28.00 of 56 µg/bij imidacloprid. (NB Volgens de studie is de hoogste concentratie gekozen omdat deze correspondeert met de dosering op het gebruiksvoorschrift van imidacloprid ter bestrijding van wittevlieg in tabak. Hoe deze omrekening gedaan is, wordt niet duidelijk uit het artikel.) Bij angelloze bijen hoeven larven niet bijgevoerd te worden maar is de voorraad in de broedcel voldoende. Alle larven aten al het aangeboden voedsel op. De totale dosis per larve is dus bekend. De ontwikkelingstijd van de larven is niet expliciet gegeven maar uit een figuur kan opgemaakt worden dat dit ongeveer 23 dagen duurde.

Parameters waren mortaliteit van eieren, larven en adulten (dagelijks gemeten); lichaamsgewicht van de 3 tot 4-d oude pop; ontwikkelingstijd van ei tot adult; loopgedrag van adulten één, vier en acht dagen na uitkomen; morfologie van de *mushroom bodies* van adulten één, vier en acht dagen na uitkomen.

Er was geen effect op ontwikkelingstijd en voedselopname, maar vanaf 0.28 µg/bij stierven alle larven (100% sterfte na ca. 20 dgn behalve bij 56 ug/bij, waarbij al na 6 dagen 100% sterfte optrad). Bij de overige doseringen overleefde minder dan 50% van de bijen tot aan het eind van de test, met uitzondering van de laagste concentatie, waar overleving slechts 55% was aan het eind van de test. De concentratierange lijkt te hoog gekozen voor het bestuderen van deze parameters gezien de hoge sterfte in alle concentraties (zelfs in de laagste nog bijna 50%). Idealiter is er in zo'n range minstens één concentratie zonder enig effect.

De mushroom bodies waren 1 d na uitkomen even groot als in de controle en namen daarna in volume toe, maar deze groei was minder groot in de behandelde bijen en deze groeiremming was dosis-gerelateerd. Op dezelfde manier liepen 1-d oude behandelde adulten normaal, maar was het loopgedrag dosis-gerelateerd aangetast na 4 en 8 dagen.

Deze bijensoort komt (net als alle angelloze bijen) niet voor in Europa en wat dat betreft is dit onderzoek dus minder relevant voor de Europese of Nederlandse toelatingssituatie. Wel blijkt hieruit dat blootstelling tijdens de larvale periode ook nog effecten kan opleveren op adulten die direct na uitkomen nog niet te zien zijn. Effecten van blootstelling op bijenlarven zullen meegenomen worden met ingang van de nieuwe EFSA guidance. Het protocol van de test voor larvale blootstelling is momenteel in ontwikkeling bij de OECD. Ctgb is hierbij betrokken door het leveren van commentaar en heeft reeds het belang van het meenemen van het adulte stadium benadrukt.

De resultaten van deze labtest zouden in het veld onderzocht moeten worden om te zien of ze op volkniveau (net als honingbijen zijn angelloze bijen eusociaal) een rol spelen.

- *Effect van thiamethoxam en clothianidin op reproductieresultaat van solitaire bijen (Sandrock et al. 2013)*

  Labstudie met de rosse metselbij waarin negatieve effecten op het reproductieresultaat van deze solitaire bij gevonden werden bij blootstelling aan 2.87 ppb thiamethoxam en 0.45 ppb clothianidin.

  Er is (vergeleken met honingbijen en hommels) nog niet veel onderzoek gedaan aan de effecten van bestrijdingsmiddelen op solitaire bijen. Deze studie is daarom belangrijk maar het onderzoek zou herhaald moeten worden in een veldsetting.

  Ctgb merkt verder op dat de gebruikte concentraties realistisch worst case zijn voor zaadbehandeling van thiamethoxam op een bij-aantrekkelijk gewas zoals koolzaad.

  Toepassingen van thiamethoxam en clothianidin op bij-aantrekkelijke gewassen zijn echter momenteel verboden in Europa (toepassing als spuitbehandeling is alleen nog toegestaan na de bloei).

  De auteurs pleiten voor een aanpassing van het toetsingskader voor bijen. Effecten op andere bestuivers dan de honingbij en in het bijzonder effecten op de gehele levenscyclus/het reproductiesucces van niet-Apis bestuivers zouden meegenomen moeten worden. Ctgb sluit zich

hierbij aan. In de hogere tier van het nieuwe EFSA guidancedocument zullen dit soort effecten op de levenscyclus van niet-Apis bijen meegenomen worden.

Uitgebreide samenvatting:
In dit onderzoek werden twee groepen *Osmia bicornis* (Rosse metselbij) gehouden in kooien waar ze gevoed werden met een nectarsubstituut en pollen. In elke kooi zaten 125 vrouwtjes en 75 mannetjes. Alle bijen kwamen uit een kweeklab in Duitsland en kwamen van dezelfde nestlocatie van een *single source population*. De nectar bevatte in de testgroep 2.87 ug/kg thiamethoxam en 0.45 ug/kg clothianidin, en in de controlegroep geen van deze stoffen (LOD 0.1 ppb). De pollen was niet behandeld. De bijen konden paren en nestelen in de kooien. Er was geen verschil in lichaamsgewicht van de vrouwtjes in beide groepen. De nesten werden vier weken na het vliegseizoen van de adulten (dat is in april/juni) opengebroken. Succesvol ontwikkelde cocons werden onder gesimuleerde winteromstandigheden gebracht en daarna weer onder warme condities om het uitkomen van de cocons te stimuleren. Vrouwtjes leefden even lang in beide groepen. In de testgroep werden echter minder nesten afgemaakt en zaten minder broedcellen per compleet nest. Ook was de relatieve sterfte van de nakomelingen hoger. Er was een significante reductie in het aantal nakomelingen per nest. Ook was de sexeratio anders: in de testgroep was 47.1% van de uitgekomen nakomelingen vrouw, in de controlegroep was dat 55.6%. Lichaamsgewicht van de uitgekomen nakomelingen verschilde niet tussen de groepen. In totaal zijn er duidelijke negatieve effecten op het reproductieresultaat van deze solitaire bij.
De auteurs wijten de effecten op het aantal nesten, het aantal broedcellen en het lagere aantal vrouwtjes aan een verlaagde foerageercapaciteit en voedselopslagefficientie. Zij hebben dit niet zelf aangetoond maar verwijzen naar ander onderzoek waarin een verlaagde voedselopslagefficientie van vrouwtjes tot deze effecten leidde. Dit lijkt Ctgb inderdaad plausibel.
Verder geven zij de hypothese dat de hogere sterfte van de nakomelingen niet van een indirect effect via foerageercapaciteit van de moeders komt, maar van een direct effect van thiamethoxam en clothianidin. Aangezien de larven aan een zeer lage hoeveelheid werkzame stoffen moeten zijn blootgesteld (omdat zij vooral met stuifmeel gevoed zijn, waar geen werkzame stof in zat, en omdat in het in de broedcellen achtergebleven stuifmeel geen werkzame stof aangetroffen is), verwachten zij dat larvale stadia gevoeliger zijn dan adulten. Deze hypothese is echter niet te bewijzen met gegevens uit dit of ander onderzoek.
De auteurs geven toe dat dit onderzoek een laboratoriumkarakter heeft en in veldsetting herhaald zou moeten worden. Dit is inderdaad nodig voor definitieve conclusies getrokken kunnen worden. Bijvoorbeeld omdat in deze studie de bijen alleen met besmette nectar gevoed zijn, terwijl ze in een veldsetting waarschijnlijk ook andere voedselbronnen zullen gebruiken. [Zie Rundlöf et al. 2015, waar effecten op osmia onderzocht zijn in een veldsetting].
Ctgb merkt verder op dat de gebruikte concentraties realistisch *worst case* zijn voor zaadbehandeling van thiamethoxam op een bij-aantrekkelijk gewas zoals koolzaad. Toepassingen van thiamethoxam, clothianidin en imidacloprid op bij-aantrekkelijke gewassen zijn echter sinds januari 2014 verboden in Europa (toepassing als spuitbehandeling is alleen nog toegestaan na de bloei). Blootstelling zal dus momenteel alleen kunnen plaatsvinden via andere routes, zoals onkruiden, planten buiten het veld, volggewassen etc. Metingen van residuniveau's via deze routes zijn niet gedaan, maar het is aannemelijk dat de gehaltes lager zullen zijn dan bij directe behandeling van een gewas.
De auters pleiten voor een aanpassing van het toetsingskader voor bijen. Effecten op andere bestuivers dan de honingbij en in het bijzonder effecten op de gehele levenscyclus/het reproductiesucces van niet-Apis bestuivers zouden meegenomen moeten worden. Ctgb sluit zich hierbij aan. In de hogere tier van het nieuwe EFSA guidancedocument zullen dit soort effecten op de levenscyclus van niet-Apis bijen meegenomen worden.

- *Effect van chronische blootstelling aan thiamethoxam en clothianidin op honingbijvolken.*
  Sandrock et al. 2014
  In dit veldonderzoek met kunstmatige blootstelling kregen honingbijvolken 45 dagen lang stuifmeel met thiamethoxam plus clothianidin en werden ze daarna nog een jaar gevolgd. Er werd een negatief effect gevonden op het aantal adulten, eieren en larven, honingproductie en stuifmeelverzameling direct na blootstelling, dat vlak voor overwintering niet meer te zien was en dat ook geen effect had op overwintersucces. Verder was er een significant effect van de a.s. op het vervangen van de koningin. Na overwintering waren behandelde volken duidelijk kleiner en hadden ze minder broed.
  De blootstellingsduur (1,5 maand) en het blootstellingsregime (al het pollen bevatte thiamethoxam en clothianidin) zijn beide worst case voor een landbouwkundige setting. De gebruikte concentraties zijn relevant voor zaadbehandeling van bloeiend gewas maar niet voor de huidige toelatingssituatie in Nederland.

Uitgebreide samenvatting:
Onderzoek naar de effecten op honingbijvolken van chronische blootstelling aan thiamethoxam en clothianidin in stuifmeel, in de tijd en met bijen van twee verschillende genetische achtergronden.
24 volken met elk ca. 20.000 volwassen bijen werden gebruikt. Veertien volken met koninginnen uit een Duitse regio met intensieve landbouw (*Apis mellifera carnica)*, en tien volken met koninginnen uit een alpiene regio in Zwitserland (vooral *A.m. mellifera*). De volken werden in twee rijen geplaatst in een bijenstand bij Zürich. De rijen werden zo geplaatst dat foerageersters zo min mogelijk naar een volk in de andere rij zouden vliegen. Na ongeveer een jaar in deze bijenstand om te zorgen dat de volken zo gelijk mogelijk waren voor wat betreft de aanwezigheid van ziekten en plagen, werden de volken van half mei tot eind juni 2011 (45 dagen) in de kast gevoerd met *pollen patties*, een mix van stuifmeel, sucrose en gist. Eén rij kreeg onbehandeld pollen, de andere rij kreeg pollen met daarin 5.31 ±0.75 ppb thiamethoxam en 2.05 ±1.8 ppb clothianidin.
Tijdens de blootstellingsfase zaten er pollenvallen voor de kastingangen om de bijen te stimuleren de pollen patties uit de kast op te nemen, en dit gebeurde ook over het algemeen binnen 48 uur. Na de blootstellingsfase werden de pollenvallen verwijderd en mochten de volken vrij foerageren. Ze werden nog tot juni 2012 gevolgd.
Er werd in beide groepen geen residu van de a.s. aangetroffen in pollen uit de pollenvallen, bijen, poppen, bijenbrood, honing en bijenwas. Het is verrassend dat ook na drie weken blootstelling in de behandelde groepen nièts werd gevonden. Ctgb merkt op dat de LODs vrij hoog waren vergeleken met de dosering, namelijk 4.0 ppb thiamethoxam en 1.0 ppb clothianidin (het artikel is hierover overigens niet geheel duidelijk), en dat lage residuen dus mogelijk gemist zijn. De LOQ is niet gegeven.
Volken werden uitgebreid beoordeeld op vier tijdstippen: drie dagen vóór blootstelling, twee dagen na blootstelling, 3,5 mnd na blootstelling en één jaar na blootstelling. Door verlies van de koningin in twee controle- en twee behandelde volken bleven er 3,5 maand na blootstelling elf volken per groep over en na één jaar tien volken per groep.
Er was geen verschil in overwintersucces (dood vs. levend), maar de controlevolken hadden significant meer volwassen bijen, eieren en larven direct na blootstelling en na overwintering (en dus niet bij het tussengelegen meetpunt vlak vóór overwintering) dan de behandelde volken. Bovendien was er een verschil tussen de twee genetisch verschillende groepen bijen : de Zwitserse alpiene bijen waren gevoeliger dan de Duitse 'landbouwbijen'. Het aantal poppen verschilde alleen na overwintering significant met de controle, en hier was geen verschil tussen de genetisch verschillende groepen. Honingproductie was significant lager in de behandelde groepen, en wederom was het effect sterker in de alpiene bijen. Stuifmeelopslag- en opname tijdens de blootstellingsperiode werd niet beïnvloed door de a.s., maar stuifmeelverzameling (van buiten de kast) wel – vanaf drie weken in de blootstellingsperiode verzamelden behandelde volken significant minder stuifmeel. Als laatste was er een significant effect van de a.s. op het vervangen van de koningin (zonder dat een deel van het volk gaat zwermen). In de twee jaar dat dit experiment liep, gebeurde dit nooit in de controlevolken, maar wel bij zes van de tien behandelde volken in het jaar na blootstelling. Zwermen (waarbij een deel van het volk bij de oude koningin in de kast blijft en een ander deel met een nieuwe koningin wegvliegt) trad juist vaker op in de controle (bij negen van de tien volken) dan in de behandeling (bij twee van de tien volken).
Er werd dus een negatief effect gevonden direct na blootstelling, dat vlak voor overwintering niet meer te zien was en dat ook geen effect had op overwintersucces, maar na overwintering waren behandelde volken duidelijk kleiner en hadden ze minder broed. Dit wordt geassocieerd met een toename in het vervangen van de koningin De auteurs denken dat de koningin, door haar langere levensduur en haar grote aantal tropholactische interacties, mogelijk veel meer a.s. binnengekregen heeft dan andere bijen uit het volk, dat zij daarom minder goed ging presteren en het daarom nodig werd de koningin in zoveel van de behandelde volken te vervangen. De nieuwe koninginnnen hadden waarschijnlijk een minder goed paarsucces en dit zou de verlaging in volkgroei kunnen verklaren. Een toename in troonopvolging is ook gebleken voor het pyrethroide cypermethrin, en acariciden die in de kast gebruikt worden tegen Varroa kunnen een negatief effect hebben op de ontwikkeling en prestaties van koninginnen (referenties genoemd in artikel).
Het korte-termijn effect op de volwassen bijen is onverwacht, aangezien pollen vooral wordt geconsumeerd door voedsterbijen en larven en veel minder door foerageersters. De auteurs verklaren het effect met subletale effecten op larven die later in hun leven zorgen voor een verminderde capaciteit om hun nest terug te vinden. In een ander artikel (Dively et al. 2015) echter wijst men op het verschil in gebruik tussen zelf verzameld stuifmeel en pollen patties.
Het verschil tussen de twee genetisch verschillende groepen bijen is interessant, maar de oorzaken hiervoor zijn niet te verklaren met deze studie.
Hoewel dit een veldonderzoek is, was de blootstelling nog kunstmatig: de bijen werden ín het volk gevoerd met behandeld artificieel stuifmeel en verzamelden dus niet zelf het behandelde voedsel uit het

veld. De blootstellingsduur (1,5 maand) en het blootstellingsregime (al het pollen bevatte thiamethoxam en clothianidin) zijn beide worst case voor een landbouwkundige setting. De gebruikte concentraties zijn relevant voor zaadbehandeling van bloeiend gewas maar niet voor de huidige toelatingssituatie in Nederland.

- *Effect van imidacloprid op honingbijvolken.* Lu et al 2012
  Veldonderzoek met langdurige, zeer hoge kunstmatige blootstelling aan behandelde high-fructose corn sirop (HFCS), een suikersiroop waar honingbijen in Amerika mee bijgevoerd worden. Bijna alle behandelde volken stierven. Ctgb heeft twijfels over de betrouwbaarheid van de studie (zie de uitgebreide samenvatting). Maar los daarvan zijn de doseringen en de blootstellingsduur in deze studie onrealistisch hoog voor de Nederlandse landbouwkundige situatie, zelfs als toepassing van imidacloprid als zaadbehandeling op bloeiend gewas toegestaan zou zijn.

Uitgebreide samenvatting:
Onderzoek in Central Massachusetts, VS. Bijenvolken (*Apis mellifera* L.) zijn gevoerd met *high-fructose corn sirop* (HFCS), een suikersiroop waar honingbijen in Amerika mee bijgevoerd worden. Er waren 16 testvolken en 4 controlevolken. Testvolken kregen van 1 juli tot en met 30 september 2010 eerst vier weken 0,1, 1, 5 of 10 ppb en daarna 9 weken 20, 40, 200 of 400 ppb imidacloprid in siroop, in de kast. 15 van de 16 testvolken gingen dood tussen 14 weken na blootstelling (eind december 2010) en maart 2011. De volken vertoonden tekenen van Colony collapse disorder (CCD) en het tijdstip van sterven was min of meer dosis gerelateerd (hoe meer imidacloprid, hoe eerder sterfte optrad). In dezelfde periode stierf slechts één van de vier controlevolken. Auteurs hebben de hypothese dat 1) subletale blootstelling in larvale stadia er voor zorgt dat volwassen bijen later minder goed kunnen overleven en 2) dat er door zaadbehandeling van maïs met imidacloprid in HFCS imidaclopridresiduen hebben gezeten sinds 2005/6, de tijd dat CCD opeens toenam. Ze hebben echter geen residumetingen uitgevoerd in oude HFCS en het is onduidelijk of het een realistische verwachting is dat er zulke hoge concentraties zitten in HFCS uit behandeld maiszaad. In alle volken, ook de controlevolken, was de broedontwikkeling sterk verschillend van de normale broedontwikkeling bij honingbijvolken in die regio in die periode, en er zijn maar weinig volken per dosering getest. Ook is het de vraag of het niet sowieso bijzonder verstorend is voor bijenvolken om tijdens de winterrust wekelijks te monitoren. Dit alles werpt twijfels op over de betrouwbaarheid van de studie. Maar los daarvan zijn de doseringen en de blootstellingsduur in deze studie onrealistisch hoog voor de Nederlandse (en Europese) landbouwkundige situatie, zelfs als toepassing van imidacloprid als zaadbehandeling op bloeiend gewas nog toegestaan zou zijn.

- *Effect van imidacloprid op honingbijvolken.* Pilling et al. 2013
  Deze publicatie beschrijft de resultaten van een groots opgezet, vierjarig monitoringsprogramma in verschillende regio's in Frankrijk naar de effecten van zaadbehandeling met thiamethoxam van mais of koolzaad. Volken zijn vier jaar lang blootgesteld aan de bloeiende maïs of koolzaad en tussentijds op een onbehandelde monitoringssite geplaatst. Er werd geen verschil gevonden tussen behandelde en controlevolken op verschillende parameters, inclusief overwintering. Soortgelijke monitoringstudies (waarschijnlijk dezelfde, maar dit is niet op te maken uit het artikel) zijn ook meegenomen bij de herbeoordeling van thiamethoxam op EU niveau (EFSA 2013c in het EASAC-rapport). De lidstaten en EFSA concludeerden dat dit zeer goed uitgevoerde studies zijn en dat ze geen indicatie geven dat er negatieve effecten te verwachten zijn van vierjarige blootstelling aan met thiamethoxam behandelde mais of koolzaad, maar dat dit niet met zekerheid te stellen valt door allerlei onzekerheden die zulke langjarige onderzoeken met zich meebrengen, en dat verdere analyse van de data nodig was.

Uitgebreide samenvatting:
Deze publicatie beschrijft de resultaten van een groots opgezet, vierjarig monitoringsprogramma in verschillende regio's in Frankrijk met maisplanten of koolzaadplanten die gegroeid waren uit met thiamethoxam behandelde zaden (88.2 g a.s./ha / 0.85 mg a.s./zaadje in mais; 12.6 g a.s./ha / 0.02 mg a.s./zaadje in koolzaad; 77 g a.s./ha / 0.03 mg a.s./zaadje in gerst). De studies bestaan uit twee delen: residumetingen en effecten op bijenvolken. Residumetingen gaven de volgende waarden: maïsstuifmeel van bijen 1-7 ug thiamethoxam/kg en 1-4 ug/kg clothianidin/kg; koolzaadstuifmeel van bijen <1-3,5 ug thiamethoxam/kg en <1 ug clothianidin/kg; koolzaadnectar van bijen 0.65-2,4 ug thiamethoxam/kg en <1 ug clothianidin/kg. In de bijenvolken waren residuen altijd op of onder de LOD (in bijenbrood en nectar 1 ug/kg, honing en honing en koninginnegelei 0.5 ug/kg). In de effectenstudie zijn dezelfde volken vier jaar lang blootgesteld aan de bloeiende maïs of koolzaad en tussentijds op een onbehandelde monitoringssite geplaatst. Er wordt geen verschil gevonden tussen behandelde en controlevolken op verschillende parameters, inclusief overwintering. Soortgelijke monitoringstudies (waarschijnlijk dezelfde, maar dit is

niet op te maken uit het artikel) zijn ook meegenomen bij de herbeoordeling van thiamethoxam op EU niveau (EFSA 2013c in het EASAC-rapport). De lidstaten en EFSA concludeerden dat dit zeer goed uitgevoerde studies zijn en dat ze geen indicatie geven dat er negatieve effecten te verwachten zijn van vierjarige blootstelling aan met thiamethoxam behandelde mais of koolzaad, maar dat dit niet met zekerheid te stellen valt door allerlei onzekerheden die zulke langjarige onderzoeken met zich meebrengen, en dat verdere analyse van de data nodig was.

- *Thompson et al 2013*
  Veldstudie met hommelvolken in een landschap met met neonicotinoïde behandeld koolzaad. Er werden geen negatieve effecten gevonden. EFSA heeft deze studie beoordeeld[7] en vanwege fouten in de studieopzet en methodiek geoordeeld dat de conclusies niet betrouwbaar zijn. Hij wordt hier daarom niet verder besproken.

- *Effect van clothianidin en imidacloprid op nestterugvindcapaciteit van honingbijen. Fischer et al 2014*
  Honingbijen werden gevangen, gevoerd met al dan niet behandelde sucroseoplossing en op een onbekende plek weer losgelaten. Algemeen gezien werd de nestterugvindcapaciteit aangetast. Volgens de auteurs is deze studieopzet relevant om een idee te krijgen over het effect op herinnering aan en orientatie in het landschap. Maar bijen in het wild komen meestal niet zomaar op een plek terecht waar ze niet zelf eerst naartoe zijn gevlogen. Bovendien zijn de concentraties veel hoger dan in Nederland te verwachten veldconcentraties, waar toepassing in bloeiende gewassen niet is toegestaan (de concentraties liggen bovendien hoger dan de relevante concentraties voor zaadbehandeling in bloeiende gewassen).

Uitgebreide samenvatting:
Op een feeder getrainde honingbijen (*Apis mellifera carnica)* werden gevangen, gevoerd met al dan niet behandelde sucroseoplossing en elders weer losgelaten zodat de bijen op basis van hun herinnering van 1) richting feeder naar hive ('vector', recent opgeslagen, want o.b.v. heenweg) en 2) algemene omgeving ('homing', als ze via de vector flight op een bekend punt in het landschap aangekomen zijn) hun weg moeten zoeken. Testdoseringen waren: 2.5 ng/bee / 25 ppb clothianidin; 7.5 ng/bee / 75 ppb imidacloprid; 11.25 ng/bee / 112.5 ppb imidacloprid; 1.25 microgram/bee/12.5 ppm thiacloprid. Volgens auteurs zijn dit niet-dodelijke doseringen, maar Ctgb merkt op dat ze dichtbij of boven de letale dosis zitten (LD50 oral uit EFSA conclusie 3.8 ng/bee clothianidin, 3.7 ng/bee imidacloprid, 17.32 microgram/bee thiacloprid). Over het algemeen was de vector flight niet erg aangetast maar de homing flight wel duidelijk (er waren wel verschillen tussen de stoffen op verschillende onderdelen/parameters). Volgens de auteurs is deze studieopzet relevant om een idee te krijgen over het effect op herinnering aan en orientatie in het landschap. Maar bijen in het wild komen niet zomaar op een onbekende plek terecht waar ze niet zelf naartoe zijn gevlogen. Bovendien zijn de concentraties veel hoger dan in Nederland te verwachten veldconcentraties, waar toepassing in bloeiende gewassen niet is toegestaan (de concentraties liggen bovendien hoger dan de relevante concentraties voor zaadbehandeling in bloeiende gewassen).

- *Effect op honingbijen van blootstelling aan met clothianidin behandeld koolzaad Cutler et al. 2014*
  Volken werden middenin bloeiende koolzaadvelden geplaatst en na 14 dagen overgebracht naar eerst een geïsoleerde bijenstand waar ze op wilde bloemen konden vliegen, en daarna naar een overwinteringslocatie. Ze werden gevolgd tot na de winter. Er was geen effect van clothianidin. Deze veldstudie is realistisch voor een deel van Canada, waar op miljoenen hectares behandeld koolzaad geteeld wordt. De blootstelling aan het behandelde gewas (gemeten met percentage koolzaadstuifmeel) in deze studie was erg hoog, wat positief is. Een nadeel is dat de controlevolken besmet bleken met clothianidin, zij het in significant lagere gehaltes dan in de behandeling. De besmetting van de controle maakt deze studie minder betrouwbaar, maar hij is zeker in de landbouwkundige situatie van Canada realistisch voor de veldsituatie, en wijst uit dat daar geen negatieve effecten op honingbijen te verwachten zijn van blootstelling aan met clothianidin behandeld koolzaad tot en met overwinteringssucces.

Uitgebreide samenvatting:

---

[7] European Food Safety Authority, 2013. Evaluation of the FERA study on bumble bees and consideration of its potential impact on the EFSA conclusions on neonicotinoids. EFSA Journal 2013;11(6):3242, 20 pp., doi:10.2903/j.efsa.2013.3242

Clothianidin wordt in een deel van Canada op miljoenen hectares koolzaad gebruikt. Deze veldstudie keek naar de effecten op honingbijen van blootstelling aan behandeld koolzaad. De studie is uitgevoerd in 2012-2013.
Het koolzaad werd behandeld met ongeveer 2,9 mg clothianidin/kg zaad, en ingezaaid met een dosering van ongeveer 16 g clothianidin/ha. Het zaadbehandelingsmiddel bevatte verder drie fungiciden, die ook in controlevelden toegepast werden. De velden lagen tenminste 10 km uit elkaar en buiten 'foerageerafstand' (niet toegelicht) van andere koolzaadvelden. De vorige behandeling met neonicotinoïden van deze velden was ten minste anderhalf jaar geleden. Er waren vijf testvelden en vijf controlevelden, elk ongeveer 2 ha. Middenin elk veld werden vier honingbijvolken (*Apis mellifera)* geplaatst, met ongeveer 11.500 bijen/volk, toen ongeveer 25% van het koolzaad bloeide (eind juni/begin juli). Na 14 dagen in het koolzaadveld werden de volken overgebracht naar een geïsoleerde bijenstand waar ze op wilde bloemen konden vliegen, en vóór de winter werden ze naar een overwinteringslocatie gebracht. De volgende parameters werden gemeten vanaf blootstelling tot oktober (overwintering) op verschillende momenten: volkgewicht vóór en na blootstelling aan het koolzaad, honingopbrengst, sterfte van volwassen bijen (inclusief residumeting), broed, aantal bijen per volk, residuen in nectar (uit raat, vers), honing, pollen (van bijen via pollenvallen) en bijenwas. Na overwintering is gekeken naar overleving van het volk, hoeveelheid gesloten broed, aantal bijen, aanwezigheid van koninging, eieren en larven, residuen in bijenwas, en aanwezigheid van Varroamijt, Acarapis mijtziekte en Nosema.
Er was geen effect van clothianidin op volkgewicht, honingopbrengst, hoeveelheid verzameld stuifmeel, ziektes/plagen, aantallen dode en levende bijen of broed.
In nectar, honing en bijenwas werd geen clothianidin aangetroffen boven de LOD van 0.35 ppb. In pollen van de behandelde velden vond men op dag 7 0.6-1.1 ppb (gemiddeld 0.9 ppb) en op dag 14 <LOQ – 1.9 ppb (gemiddeld 0.8 ppb). In volken uit controlevelden werd ook clothianidin aangetroffen, alleen op dag 14: 2x < LOQ, 0.35, 0.5 en 1.3 ppb. De auteurs onderwierpen de gemiddelde residuniveau's in de 14 dagen blootstellingsperiode aan statistische analyse en vonden significant hogere clothianidinresiduen in de volken uit de behandelde velden (meer dan driemaal zo hoog).
Andere bestrijdingsmiddelen werden ook aangetroffen in beide testgroepen, zowel acariciden (diergeneesmiddel) als gewasbeschermingsmiddelen (met name chloorthalonil).
Er was hoge wintersterfte: 37% in de controle en 26% in de behandeling (niet statistisch significant verschillend). Deze wintersterfte kwam overeen met de gemiddelde sterfte dat jaar in de regio (in Nederland wordt wintersterfte van ca. 10% als normaal gezien). De auteurs denken dat er mogelijk een correlatie is tussen de infectiegraad met Nosema en wintersterfte. Zij hebben Nosema echter in dode volken gemeten in dode bijen en in levende volken in levende bijen, en deze conclusie is daarom moeilijk uit de studie op te maken. Een andere verklaring is echter niet te geven.
Pollenanalyse wees uit dat de bijen veel foerageerden op het koolzaad, met 88% van al het stuifmeel van koolzaad tijdens de eerste week in het veld. Tijdens de tweede week daalde dit sterk, en op dag 14 was nog maar 46% van het stuifmeel van koolzaad. De rest kwam vooral van wilde bloemen of siergewassen en voor een klein deel van maïs. Na verplaatsing naar de bijenstand werd geen stuifmeel van gewassen meer gevonden. Er was geen verschil tussen controle en behandelde volken.
De blootstelling aan het behandelde gewas in deze studie was dus erg hoog, wat positief is. Een nadeel is dat de controlevolken besmet bleken met clothianidin, zij het in significant lagere gehaltes dan in de behandeling. De studie voldeed aan de aanbeveling van EFSA om velden tenminste vier kilometer uit elkaar te hebben en gezien de afstand van ten minste tien kilometer is het zeer onwaarschijnlijk dat controlebijen op behandelde velden gefoerageerd hebben. Het is ook onwaarschijnlijk dat er residuen uit voorgaande jaren via de bodem in de planten terecht is gekomen, aangezien dan op dag 7 al clothianidin gevonden zou moeten zijn, of dat de zaaimachines besmet waren, want alle controlevelden zijn eerder ingezaaid dan de behandelde velden. De auteurs denken dat de meest waarschijnlijke bron van besmetting spuittoepassing van thiamethoxam is geweest, met besmetting van wilde planten via drift, en omzetting van thiamethoxam in de metaboliet clothianidin. De besmetting van de controle maakt deze studie minder betrouwbaar, maar hij is zeker in de landbouwkundige situatie van Canada realistisch voor de veldsituatie, en wijst uit dat daar geen negatieve effecten op honingbijen te verwachten zijn van blootstelling aan met clothianidin behandeld koolzaad tot en met overwinteringssucces.
In de Zwitserse veldstudie van Sandrock et al. 2014 werd wél effect gevonden op honingbijen. Het daar gevonden meetpunt later in de zomer is niet meegenomen in de huidige studie. In de herfst is echter in beide studies gemeten en werd alleen in de Zwitserse studie effect gevonden. Een verschil tussen beide studies is het veelvuldig optreden van vervanging van de koningin in de Zwitserse studie terwijl daarvan geen melding wordt gedaan in de huidige studie. Verder werd er in Zwitserse studie gevoerd met pollen patties in het volk, en was de Canadese studie een volledig realistische veldstudie met blootstelling alleen via foerageren van de bijen op het behandelde gewas.

- *Effect van clothianidin op honingbijen, hommels en solitaire bijen Rundlöf et al. 2015*[8] *(niet in EASAC-rapport want later gepubliceerd in Nature)*

De auteurs concluderen dat clothianidin als zaadcoating in koolzaad negatieve effecten heeft op wilde bijen, met potentieel negatieve effecten op populatieniveau. Hoewel vanwege verontreiniging met andere stoffen en een mogelijk effect van niet volledig blind uitgevoerde monitoring de controle niet volledig vergelijkbaar is met de behandelde velden, vindt Ctgb de resultaten toch zorgwekkend. Het minder voorkomen van wilde bijen in en rond behandelde velden verdient meer onderzoek voordat hierover definitieve conclusies kunnen worden getrokken. Het totale gebrek aan nestelactiviteit van de solitaire bijen is moeilijk te verklaren, maar in een laboratoriumstudie (Sandrock et al. 2013) werd ook een afname in reproductie gezien van de combinatie van thiamethoxam en clothianidin. Het negatieve effect op de reproductie van hommels is ook al gezien in ander onderzoek (bijvoorbeeld Laycock et al. 2013, Mommaerts et al. 2010). Het lijkt erop dat hommels minder foerageren op stuifmeel en nectar met neonicotinoïden en daardoor minder broed produceren en het volk minder hard groeit. Dit wordt nu ook in een veldsituatie gezien.
De auteurs concluderen ook dat de honingbij niet geschikt is als indicatorsoort voor alle bijen, zeker niet in de hogere tier. Dit onderschrijft Ctgb en onderstreept het belang van opname van deze bestuivers in de nieuwe EFSA guidance.
De waarnemingen laten verder zien dat via stofdrift van behandeld zaad blootstelling van akkerranden kan plaatsvinden. Dit is bekend en opgenomen in toekomstige guidance, en in Nederland worden sinds 2010 maatregelen genomen om stofdrift zoveel mogelijk tegen te gaan

Uitgebreide samenvatting

Dit onderzoek gaat over de vraag hoe neonicotinoïden bijen beïnvloeden op veldrealistische landbouwschaal. In Zuid-Zweden zijn acht behandelde en acht onbehandelde velden, gepaard op basis van vergelijkbaarheid in omgeving. De velden zijn ingezaaid met koolzaad dat behandeld was met het fungicide thiram, of met thiram plus clothianidin plus beta-cyfluthrin. De dosering thiram is niet vermeld. De dosering van de insecticiden was 25 mL Elado/kg seed (400 g/L clothianidin en 80 g/L beta-cyfluthrin), met 7.7 kg zaad/ha. Dit leidt tot 77 g clothianidin/ha en 15.4 g beta-cyfluthrin/ha.
Tijdens de bloei is gekeken hoeveel en welke solitaire bijen en hommels (hierna 'wilde bijen' genoemd) voorkwamen, zowel in de velden als in en vlak naast de randen, en wat de dekkingsgraad van de koolzaadbloemen was in het veld. De bloemdichtheid was positief gecorreleerd met het aantal wilde bijen, en de bloemdichtheid was hoger in behandelde velden. Desondanks was het aantal wilde bijen significant lager in en langs behandelde velden. De grootte van het veld was positief gecorreleerd met het aantal wilde bijen, maar het gehalte landbouwgebied in de omgeving had geen invloed.
De aantallen wilde bijen staan vermeld in extended data table 7. Hierin is te zien dat er vooral veel hommels waargenomen zijn. De aantallen zijn voor de solitaire bijen erg laag per soort. In totaal zijn in de testvelden ongeveer twee keer zoveel wilde bijen waargenomen als in de controlevelden (dit geldt zowel met als zonder *Bombus terrestris*, die zowel wild als gekweekt kan zijn). De monitoring in het veld is 'blind' uitgevoerd, maar de waarnemers in de randen wisten of hun veld behandeld was of niet. Het is helaas niet te bepalen of hierdoor de resultaten mogelijk zijn beïnvloed, aangezien niet is vermeld hoeveel bijen in het veld en hoeveel in de randen zijn gezien.
Drie nesten met elk 27 cocons van de rosse metselbij (*Osmia bicornis)* zijn vlak voor de bloei naast elk veld geplaatst en er is gevolgd hoeveel nestactiviteit er was van de uitgekomen bijen. Osmiavrouwtjes bouwen hun broedcellen het liefst bovenop het nest waar ze zelf uitgekomen zijn, dus er werd verwacht dat ze zouden nestelen in hun oude nest. In zes van de acht controlevelden deden ze dit ook, maar in geen van de acht testvelden. Dit is een duidelijk effect van de behandeling, hoewel het werkingsmechanisme onbekend is. De auteurs speculeren dat het komt door een reductie in navigatiecapaciteit. Het totale gebrek aan nestelactiviteit van de solitaire bijen is moeilijk te verklaren, maar in een laboratoriumstudie (Sandrock et al. 2013) werd ook een afname in reproductie van Osmia gezien van de combinatie van thiamethoxam en clothianidin.
Bij het begin van de bloei zijn zes hommelvolken (*Bombus terrestris*, ca. 10 weken oud, met één koningin, ongeveer 50 werksters en broed in alle stadia) naast elk veld geplaatst. De volken werden gedurende de tijd op het veld drie tot vijf keer gewogen. Zodra in één van de twaalf volken van een veldpaar nieuwe koninginnen werden gevormd, werden alle volken ingevroren. Dit gebeurde 22-38 d na introductie op het veld. In vier van de zes volken werd het aantal koningin en werkster/darcellen, het gewicht van de cocons, larven en neststructuur, en het aantal opslagcellen voor nectar en pollen bepaald. Een negatief effect van de behandeling werd gevonden op nestgroei (lagere toename in gewicht en

[8] Rundlöf, Andersson, Bommarco, Fries, Hederström, Herbertsson, Jonsson, Klatt, Pedersen, Yourstone, Smith. Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. Nature, 520, 416 (23 April 2015); DOI: 10.1038/nature14420.

lagere groeisnelheid) en reproductie (minder cocons van koninginnen en werksters/darren) van de hommels.
Bij het begin van de bloei zijn ook zes honingbijvolken (*Apis mellifera)* bij elk veld geplaatst. De volken bevatten elk ongeveer 3400 volwassen bijen. Na anderhalve maand zijn de volken verplaatst naar een overwinterlocatie en is het aantal volwassen bijen opnieuw bepaald, met de Liebefeldmethode. Volgens een *power* analyse kan een verschil van 20% in volkgrootte bepaald wordt met een *power* van 0.8. Er werd geen effect gevonden.
Het gehalte koolzaadpollen dat door de verschillende soorten verzameld werd, is bepaald met stuifmeelvallen aan de honingbijkasten (53% in controle, 63% in test), van hommels in het veld (88% in controle, 75% in test), en uit broedcellen van de metselbijen (35%, alleen in controle, want geen broedcellen in test).
Residuen van clothianidin, beta-cyfluthrin en vier andere neonicotinoïden die in Zweden gebruikt mogen worden (acetamiprid, imidacloprid, thiamethoxam en thiacloprid) zijn tijdens de bloei gemeten in stuifmeel en nectar verzameld van foerageersters op het veld. Vijf honingbijen met pollen en tenminste vijf met nectar werden verzameld per veld (op twee controlevelden na, waar geen pollenfoerageersters gevonden werden). Ook werd van drie tot vijf hommels per veld de nectar verzameld (op één controleveld na, waar slechts één hommel met nectar gevonden werd).
Beta-cyfluthrin werd niet gevonden boven de LOD van 1 ng/g, wat in overeenstemming is met de verwachtingen voor deze niet-systemische stof.
Van honingbijen werd clothianidin in alle acht behandelde velden aangetroffen in nectar (6.7-16, gemiddeld 10.3 ng/g) en pollen (6.6-23, gemiddeld 13.9 ng/g), maar ook in nectar van twee controlevelden (wel in veel lagere concentratie, 0 en 0.61, mean 0.1 ng/g). Het is niet bekend of de controlevelden waar clothianidin in de nectar zat, dezelfde waren als de velden waar geen pollenfoerageersters gevonden werden, dus het is niet uit te sluiten dat in totaal vier controlevelden verontreinigd waren met clothianidin.
De hommelnectar bevatte geen clothianidin in de controlevelden en 1.4-14, mean 5.4 ng/g, clothianidin in de testvelden.
Verder valt op dat in de testvelden ook thiacloprid aangetroffen werd (pollen in vier velden, max. 0.29 ppb; nectar in twee velden, max. 0.044 ppb, dit is een waarde onder de LOQ). In de controlevelden werden ook verschillende andere stoffen aangetroffen in zowel nectar als pollen: acetamiprid, imidacloprid, thiacloprid en thiamethoxam (in één tot drie velden, met maximumgehaltes van 0.19 tot 1.4 ppb). Op thiacloprid na werden deze stoffen niet gevonden in de testvelden. Volgens de gegevens van de boeren is slechts op één controleveld thiacloprid gespoten (ondanks het verzoek van de onderzoekers dit in geen enkel veld te doen).
Deze veldstudie reflecteert de normale landbouwsituatie en verontreiniging van de controles was waarschijnlijk onvermijdelijk. Het feit dat de controlevelden wat betreft gehalte andere stoffen niet vergelijkbaar zijn met de testvelden maakt de resultaten wel minder betrouwbaar. Bovendien zijn de gemiddelde concentraties en ranges niet vermeld, waardoor het lastig is een beeld te krijgen van de werkelijke blootstelling in de verschillende velden.
In alle controle- en testvelden, met uitzondering van één controleveld, zijn bovendien één of twee behandelingen geweest met indoxacarbmiddelen, tot vlak voor de bloei. Het gehalte indoxacarb in de bloemen is niet gemeten zodat het niet duidelijk is of hier verschillen waren tussen controle en testvelden.
Bloemen en bladeren werden verzameld in de akkerranden die gebruikt werden voor wilde bij-monitoring, binnen twee dagen na zaaien (controle en test) en twee weken na zaaien (alleen testvelden). Clothianidin werd niet aangetroffen in de controlevelden, wel in de testvelden in 0-5.9, mean 1.2 ng/g vlak na zaaien en 0-6.5, mean 1.0 ng/g, na twee weken. Dit zijn residugehalten in hele planten, niet in nectar en stuifmeel, en als zodanig dus minder relevant voor een risicobeoordeling voor bijen via voedsel. De waarnemingen laten zien dat via stofdrift blootstelling van akkerranden kan plaatsvinden. Dit is bekend en opgenomen in toekomstige guidance, en in Nederland worden sinds 2010 maatregelen genomen om stofdrift zoveel mogelijk tegen te gaan. De auteurs concluderen dat clothianidin als zaadcoating in koolzaad negatieve effecten heeft op wilde bijen, met potentieel negatieve effecten op populatieniveau. Hoewel vanwege verontreiniging met andere stoffen en een mogelijk effect van niet volledig blind uitgevoerde monitoring de controle niet volledig vergelijkbaar is met de behandelde velden, vindt Ctgb de resultaten toch zorgwekkend. Het minder voorkomen van wilde bijen in en rond behandelde velden verdient meer onderzoek voordat hierover definitieve conclusies kunnen worden getrokken. Het totale gebrek aan nestelactiviteit van de solitaire bijen is moeilijk te verklaren, maar in een laboratoriumstudie (Sandrock et al. 2013) werd ook een afname in reproductie gezien van de combinatie van thiamethoxam en clothianidin. Het negatieve effect op de reproductie van hommels is ook al gezien in ander onderzoek (bijvoorbeeld Laycock et al. 2013, Mommaerts et al. 2010). Het lijkt erop dat hommels minder foerageren

op stuifmeel en nectar met neonicotinoïden en daardoor minder broed produceren en het volk minder hard groeit. Dit wordt nu ook in een veldsituatie gezien.
De auteurs concluderen ook dat op basis van de uitkomsten van deze studie blijkt dat de honingbij niet geschikt is als indicatorsoort voor alle bijen, zeker niet in de hogere tier. Dit onderschrijft Ctgb.

- *Onderzoek naar de mogelijkheid van honingbijen en hommels onderscheid te maken tussen suikerwater met en zonder imidacloprid, clothianidin of thiamethoxam.* *Kessler et al. 2015*[9] *(niet in EASAC-rapport want later gepubliceerd in Nature)*
  De auteurs trekken de conclusie dat hommels en honingbijen neonicotinoïden niet kunnen proeven. Zij verklaren de gevonden voorkeur voor sucrose met neonicotinoïden uit de invloed die deze stoffen hebben op de nACh-receptoren in de hersenen – zo zouden zij de neurale mechanismen beïnvloeden die betrokken zijn bij het leren over de locatie van voedsel.
  Naar de mening van het Ctgb is dit een interessante en goed uitgevoerde studie. De bevinding dat zowel hommels als honingbijen in het lab concentraties die kunnen voorkomen bij zaadbehandeling van een aantrekkelijk gewas niet vermijden, soms zelfs prefereren, maar daardoor in totaal minder voedsel opnemen, is vergelijkbaar met het effect van nicotine op mensen. Bij honingbijen worden echter geen schadelijke effecten gevonden op volkniveau in het veld en dus speelt dit effect op veldrealistische schaal blijkbaar geen belangrijke rol (zie bijvoorbeeld Rundlöf et al, 2015). Voor hommels is dit anders (zie bijvoorbeeld hetzelfde onderzoek). Deze studie onderbouwt daarom het belang van het opnemen van hommels in het toetsingskader.

Uitgebreide samenvatting
Onderzoek naar de mogelijkheid van honingbijen (*Apis mellifera*) en hommels (*Bombus terrestris)* onderscheid te maken tussen suikerwater met en zonder imidacloprid, clothianidin of thiamethoxam. Hommelwerksters werden individueel in bakjes gezet (tussen de 36 en 66 hommels per testconcentratie). Honingbijwerksters zaten met 25 bij elkaar in een bak (40 groepen van 25 per testconcentatie). Elke bak bevatte drie (voor hommels) of vijf (voor honingbijen) buisjes: één met water, één (of twee) met sucroseoplossing (0.5 M), en één (of twee) met sucroseoplossing (0.5 M) plus een neonicotinoïde. Na 24 u werd gekeken of de bijen dood of levend waren en hoeveel van de suikeroplossingen gegeten was. Concentraties van de neonicotinoïden waren 1 nM (ca.0.26 ppb), 10 nM (ca.2.6 ppb), 100 nM (ca. 26 ppb) en 1 µM (ca.260 ppb).
Bij 1 en 10 nM (realistische concentraties bij zaadbehandeling van een bloeiend gewas) hadden de hommels een significante voorkeur voor de neonicotinoïdenoplossing, bij hogere concentraties hadden zij voorkeur noch afkeur. De honingbijen hadden juist bij de drie hoogste concentraties een significante voorkeur voor de neonicotinoïden. Alleen 1 µM thiamethoxam en clothianidin zorgde voor significante sterfte na 24 uur bij beide soorten (ca. 80% bij hommels en 20% bij honingbijen), alle andere concentraties niet. Deze sterfte is niet verrassend aangezien de dosering per bij bij 1 µM in de range zit van de LD50 voor honingbijen.
De leeftijd van de bijen lijkt een rol te spelen. Bovenstaand resultaat komt uit proeven met foerageersters die gevangen werden terwijl ze terugkwamen van het veld. Net uitgekomen bijen, die nog geen foerageerervaring hadden, vermeden concentraties van 1 (hommels en honingbijen) en 10 nM (alleen hommels) imidacloprid wél.
Hoewel ervaren bijen dus sucroseoplossing met neonicotinoïden niet vermijden, of zelfs prefereren boven onbehandelde sucroseoplossing, nemen ze er in totaal wel statistisch significant minder van op. Dit was zo bij thiamethoxam (bij de hoogste dosering), clothianidin (bij hommels bij de twee hoogste doseringen en bij honingbijen bij de hoogste) en imidacloprid (bij hommels bij alle doseringen, bij honingbijen bij de twee hoogste).
Met honingbijen zijn nog twee testen gedaan: eerst de Proboscis Extension Reflex (PER) test (druppel 1 M sucroseoplossing op de antenne, als een bij voedsel herkent steekt zij haar proboscis uit; 40 bijen per concentratie) en direct daarop een druppel 1 M sucroseoplossing op de proboscis om te zien of de bij het opeet (10 bijen per concentratie). Concentraties van de drie neonicotinoïden waren 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM en 10 µM. Er werd geen effect gevonden op proboscis extension of retraction (dus: de bijen staken bij elke concentratie hun tong uit, en namen het voedsel vrijwel altijd op).
Electrofysiologische opnames zijn gemaakt van de smaakneuronen in zintuighaartjes (sensilla chaetica) op een monddeel (de galea) van levende honingbijen en hommels (vastgezet in een harnas). Met deze sensilla herkent een bij voedings- en giftige stoffen. Giftige stoffen geven een reactie in bepaalde neuronen of juist een onderdrukking van andere. De sensilla werden gestimuleerd met een electrode met

[9] Kessler, Tiedeken, Simcock, Derveau, Mitchell, Softley, Stout & Wright. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. Nature, 22 April 2015; DOI: 10.1038/nature14414.

verschillende oplossingen. Sucrose, zout en *nicotine hydrogen tartrate* gaven een duidelijke reactie in neuronactiviteit. De neonicotinoïden gaven geen grotere respons dan water bij 1 nM en 1 µM. Ook was er geen verschil in reactie op suikerwater zonder, of met 1, 100 nM of 1 µM neonicotinoïden.
Deze resultaten werden gezien zowel bij ervaren foerageersters als net uitgekomen honingbijen. De auteurs trekken de conclusie dat hommels en honingbijen neonicotinoïden niet kunnen proeven. Zij verklaren de voorkeur voor sucrose met neonicotinoïden met de invloed die deze stoffen hebben op de nACh-receptoren in de hersenen – zo zouden zij de neurale mechanismen beïnvloeden die betrokken zijn bij het leren over de locatie van voedsel. Andere studies laten juist zien dat het leervermogen en geheugen van honingbijen worden aangetast door neonicotinoïden (waardoor je zou verwachten dat ze juist niet naar een voedselbron terugkeren met neonicotinoïde). De auteurs zoeken een verklaring voor deze tegenstelling in de kortere blootstellingsduur in dit experiment of in verschillende gevoeligheid van nACh-receptoren in de hersendelen die voor deze taken verantwoordelijk zijn. Dit laatste zou volgens hen ook het verschil in vermijding van imidacloprid tussen ervaren foerageersters en net uitgekomen werksters kunnen verklaren.
Naar de mening van het Ctgb is dit een interessante en goed uitgevoerde studie. De bevinding dat zowel hommels als honingbijen in het lab concentraties die kunnen voorkomen bij zaadbehandeling van een aantrekkelijk gewas niet vermijden, soms zelfs prefereren, maar daardoor in totaal minder voedsel opnemen, is vergelijkbaar met het effect van nicotine op mensen. Bij honingbijen worden echter geen schadelijke effecten gevonden op volkniveau in het veld en dus speelt dit effect op veldrealistische schaal blijkbaar geen belangrijke rol (zie bijvoorbeeld Rundlöf et al, 2015). Voor hommels is dit anders (zie bijvoorbeeld hetzelfde onderzoek). Deze studie onderbouwt daarom het belang van het opnemen van hommels in het toetsingskader.

- *Effect van imidacloprid op honingbijen* <u>*Dively et al. 2015*</u> *(Niet in EASAC want later gepubliceerd)*
  Veldstudie. Kunstmatige blootstelling aan 20 en 100 µg/kg imidacloprid gedurende 12 weken in de vroege zomer had negatieve effecten op de gezondheid van de honingbijvolken, maar blootstelling aan 5 µg/kg niet.
  Het onderzoek werd twee jaar achter elkaar uitgevoerd. Ctgb wijst erop dat de effecten over het algemeen erg verschilden tussen de twee jaren. De analyses zijn niet altijd helder gepresenteerd. Sommige effecten lieten een duidelijke dosis-repons zien zonder significantie bij enkele doseringen en het is niet helemaal duidelijk waarom de auteurs concluderen dat er geen effect was bij 5 maar wel bij 20 en 100 µg/kg. Dit is mogelijk vooral gebaseerd op de voor beide jaren samengevoegde volkoverlevingsdata, waar zij bij 5 geen maar bij 20 en 100 µg/kg wel significante effecten vinden.
  De auteurs betwijfelen zelf of een 12-weken blootstellingsregime realistisch is voor de veldsituatie en Ctgb sluit zich daarbij aan. Ook wijzen zij op het belang van het meenemen van overwintering in honingbijveldstudies. Vóór de winter werden in 2009 geen significante effecten gevonden, maar ná de winter wel. Subletale effecten kunnen dus zo subtiel zijn dat ze gemist worden in statistische analyse, maar ze kunnen dan toch de overleving in de winter significant beïnvloeden. Meenemen van overwintering is een onderdeel van de aanbevelingen voor veldstudies in de nieuwe EFSA guidance. De grote verschillen tussen de twee jaren in deze studie pleit er voor om meerdere jaren achter elkaar te testen, omdat anders effecten mogelijk gemist worden. Hoeveel jaar gemeten zou moeten worden, is echter niet bekend.

<u>Uitgebreide samenvatting</u>
Honingbijvolken (*Apis mellifera)* zijn gedurende twaalf weken (twee á drie broedcycli, mei tot begin augustus) continu blootgesteld aan 0, 5, 20 of 100 µg/kg imidacloprid (via pollensubstituut in de kast) en daarna gevolgd tot na de overwintering. Alle volken stonden in bijenstanden in Maryland, USA. Binnen 3 km werd geen imidacloprid gebruikt (wel andere neonicotinoiden in een deel van de maïs in de buurt; deze zijn niet verder benoemd noch meegenomen in de residumetingen). In 2009 zijn 10 volken/behandeling gebruikt met ca.15.000 bijen/volk aan het begin van de test, in 2010 7 volken met ca. 16.000 bijen/volk aan het begin van de test. De bijen mochten vrij foerageren, maar werden gestimuleerd het pollensubstituut te eten door middel van pollenvallen bij de ingang van de kast.
Parameters: status van het volk (aantal cellen, bijen, gesloten broed, open cellen met larven, honingcellen en bijenbrood); ongebruikelijke aanwezigheid van cellen met darren, dode larven, abnormaal gedrag van werksters, abnormaal broedpatroon, tekenen van ziekte, aanwezigheid van plagen; foerageeractiviteit; aanwezigheid van ziektes.
In 2009 was de frequentie van 'queen events' (het vervangen van de koningin, door de bijen zelf of door de imker, omdat de oude koningin zwak of dood was) positief gecorreleerd met de dosis (1 in de controle, 2 bij 5 ppb, 4 bij 20 ppb, 4 bij 100 µg/kg). In de herfst was er een positieve correlatie tussen dosis en

Varroa en bij 100 ppb hadden de volken significant meer Varroamijten. Na overwintering was deze correlatie er niet meer (alleen gemeten in de overlevende volken). Er was nooit een significante relatie met Nosema. Foerageeractiviteit was in augustus en september (dus in de twee maanden na blootstelling) significant lager in de behandelde volken dan in de controle, maar het enige effect op de status van het volk was een positief effect op de honingvoorraad bij 100 µg/kg (significant meer honingcellen) direct na blootstelling. Dit effect was later in de herfst (2 maanden na blootstelling) en na overwintering niet meer te zien. Hoewel de volken dus geen effect lieten zien in sterkte, was er wel een statistisch significant effect op lager overwintersucces bij 100 µg/kg, en een trend bij lagere doses. De auteurs wijten dit aan de hogere frequentie van 'queen events' en daaruit volgende verstoringen in broedzorg bij de hogere doseringen.
In 2010 werd de proef herhaald met vrijwel dezelfde opzet, behalve dat er zeven in plaats van tien volken per behandeling waren en dat de proef iets later in mei begon en dus ook later in augustus eindigde. Dit jaar was er geen relatie tussen 'queen events' en dosis (er waren zelfs meer 'queen events' bij 0 en 5 µg/kg dan bij 20 en 100 µg/kg. Er waren geen significante verschillen in Varroabesmetting tussen doseringen, maar regressieresultaten wezen wel uit dat er een significante toenemende trend was met dosering. Nosema kwam vrijwel niet voor en had geen relatie met dosering. Foerageeractiviteit werd niet negatief beïnvloed door imidacloprid. Controlevolken foerageerden significant minder, wat volgens de auteurs kwam door verstoringen in broedzorg door meer 'queen events'. Er waren geen significante effecten op volkparameters, maar er was wel een significant verschil tussen broedproductie in de controle en alle behandelingen samen. Bij 100 µg/kg werd wederom meer honing verzameld maar dit effect was dit jaar niet significant. Overwintersucces was veel lager dan in 2009, vanwege de milde winter en de daardoor veroorzaakte uitputting van voedselvoorraden (4 van 7 in de controle, 3 van 7 in de testgroepen). Er was geen relatie met de dosering.
Residuen van imidacloprid en metabolieten werden gemeten in bijen uit de kast en in bijenbrood, tot in oktober. In 2009 werd in een zeer klein deel (<5%) van de controlesamples imidacloprid aangetroffen. In deze controlesamples zat ongeveer evenveel a.s. als in de samples uit de behandelde groepen. In de behandelde volken nam het residugehalte direct na blootstelling toe met toenemende dosis; in oktober was deze relatie er niet meer. In 2010 waren alle controleresiduen onder de LOD (0.2 µg/kg voor imidacloprid). In de testvolken waren de residuen in bijen en bijenbrood lager dan in 2009 en er was geen relatie tussen residugehalte en blootstellingsdosis.
In 2011 werd met 8 volken (grootte niet vermeld) per behandeling onderzoek gedaan naar het gedrag en de lotgevallen van imidacloprid in bijenvolken. Concentraties waren 0, 20 (in suikersiroop) of 100 µg/kg (in pollensubstituut) imidacloprid. De auteurs berekenden dat bij beide doseringen er ongeveer 40 µg imidacloprid/kg/volk/week opgenomen werd. Blootstelling duurde zes weken, vanaf mei. In acht van de 87 controlesamples werden lage gehaltes aangetroffen, volgens de auteurs het resultaat van drift, besmetting tijdens monstername of roof uit een ander volk. Bovendien bevatte één sample een hoog gehalte; dit werd beschouwd als outlier.
Residuen bij 100 µg/kg waren significant hoger en werden significant vaker gevonden dan bij 20 µg/kg. De hoogste gehaltes werden gevonden bij 100 µg/kg in honing (range 2.8-13.4, gemiddeld 6.5-7.2 µg/kg), gevolgd door lagere maar consistente gehaltes in bijenbroed (range 0.5-1.7, gemiddeld 0.9-1.0 µg/kg) en bijen (range 0.2-1.9, gemiddeld 0.3-0.7 µg/kg). In larven werd vrijwel nooit imidacloprid gevonden. Zes weken na blootstelling aan 100µg/kg waren de gehaltes iets lager maar samples waren even vaak positief. Bij 20µg/kg waren de gehaltes lager en namen ze sneller af.
Direct na zes weken blootstelling werd ook koninginnegelei bemonsterd (de koningin was tijdelijk gescheiden van haar volk om de productie ervan op gang te brengen). Dit bevatte geen gehaltes >LOD bij 20µg/kg, maar wel bij 100 µg/kg (range 0.3-1.0 µg/kg, gemiddeld 0.6 µg/kg).
De metabolieten werden nooit gevonden boven hun LOD.
De bijenvolken gebruikt in dit residuexperiment werden ook onderzocht op volkparameters. Volkgrootte werd niet beïnvloed, maar in augustus hadden volken met 100 µg/kg significant minder raten met bijen dan in de andere twee groepen. Verder waren er geen effecten. Overwintering is niet meegenomen bij deze groep.
De hoge gehaltes in honing bij 100 µg/kg in pollensubstituut zijn verrassend, omdat hogere gehaltes verwacht werden bij 20 µg/kg via suikersiroopEen mogelijke verklaring is dat bijen pollensubstituut sneller verwerken in voedsel dan pollen van bloemen, dat langer opgeslagen wordt. Ook worden gehaltes hoger doordat vocht verdampt uit de nectar. Verder zijn de gehaltes in koninginnegelei verrassend, aangezien dit geproduceerd wordt via verwerking van voedsel in bijen, en het metabolisme van imidacloprid in bijen snel is (DT50 4-5 uur). De auteurs concluderen dat de residugehaltes die bij 100 µg/kg gevonden werden, een worst-case scenario vormen voor veldblootstelling aan imidacloprid op volkniveau. Aangezien de gehaltes in deze volken min of meer gelijk zijn aan de gehaltes die gevonden worden in stuifmeel en nectar van met imidacloprid zaadbehandeld bloeiend gewas, kan Ctgb hiermee instemmen.

Bij 20 µg/kg waren de gehaltes lager. Gemiddelde gehaltes worden niet gegeven, maar de auteurs zeggen zelf dat de chronische dosis ook bij 20 µg/kg de veldrealistische doses bij zaadbehandeling ver overschreedt. Bij 5 µg/kg zijn alleen metingen gedaan in de toxiciteitsexperimenten van 2009 en 2010 en deze zijn nauwelijks gerapporteerd (de enige specifiek voor deze dosering gerapporteerde waarde is een gemiddeld residuniveau van 1.2µg/kg in bijenbrood in 2009). Er is dus niets te zeggen over het realisme voor de praktijk van de gehaltes ín het volk bij de 5 µg/kg dosering. Ctgb merkt nog op dat de residumetingen gebaseerd zijn op zes weken blootstelling en de effectdata op twaalf weken blootstelling. Foerageeractiviteit liet geen effect zien. Varroabesmetting wel, in beide jaren. Er was geen effect te zien op de status van het volk tijdens en na blootstelling vóór de winter, behalve een hoger aantal 'queen events' in 2009. Als data van beide jaren samengevoegd worden, vinden de auteurs dat 100, 94.1, 82.4 en 82.4% van de volken tot in oktober overleefde bij respectievelijk 0, 5, 20 en 100 µg/kg imidacloprid. Dit is niet statistisch significant, maar de auteurs vinden dat de dosis-response erop wijst dat er uitgestelde subletale effecten optraden in de twee hogere doseringen. De auteurs hebben verder de volkoverlevingsdata van beide jaren samengevoegd voor oktober, februari en maart, en vinden dan een overall significant doseringseffect en bovendien significante effecten bij 20 en 100 µg/kg imidacloprid (maar niet bij 5 µg/kg). Na de winter, in maart, overleefde 82.4, 58.8, 47.1 en 52.9% bij respectievelijk 0, 5, 20 en 100 µg/kg imidacloprid (data van beide jaren samengevoegd).
Op basis van deze resultaten en dosis-responsrelaties voor verschillende volkparameters vóór de winter concluderen de auteurs dat blootstelling aan 20 en 100 µg/kg imidacloprid via pollensubstituut gedurende 12 weken in de vroege zomer, negatieve effecten heeft op de gezondheid van de honingbijvolken, maar blootstelling aan 5 µg/kg niet. Waarschijnlijk doelen de auteurs met de 'dosis-responsrelaties' op de volgende effecten, waarvan de meeste alleen gezien werden in één van beide jaren: meer 'queen events' en daaropvolgende verstoring van broedzorg in 2009 bij 20 en 100 µg/kg , hogere Varroabesmetting bij hogere dosering in beide jaren (significant bij 100 µg/kg in 2009), meer honingcellen bij 100 µg/kg in 2009 (wat volgens hen wijst op mogelijke vermijding van besmet voedsel), en minder bijenbroed met toenemende dosering in 2010.
Ctgb wijst erop dat de effecten over het algemeen erg verschilden tussen de twee jaren. De analyses zijn niet altijd helder gepresenteerd. Sommige effecten lieten een duidelijke dosis-repons zien zonder significantie bij enkele doseringen en het is daarom niet helemaal duidelijk waarom de auteurs concluderen dat er geen effect was bij 5 maar wel bij 20 en 100 µg/kg. Dit is mogelijk vooral gebaseerd op de voor beide jaren samengevoegde volkoverlevingsdata, waar zij bij 5 geen maar bij 20 en 100 µg/kg wel significante effecten vinden.
De auteurs betwijfelen zelf of een 12-weken blootstellingsregime realistisch is voor de veldsituatie en Ctgb sluit zich daarbij aan. Ook wijzen zij op het belang van het meenemen van overwintering in honingbijveldstudies. Vóór de winter werden in 2009 geen significante effecten gevonden, maar ná de winter wel. Subletale effecten kunnen dus zo subtiel zijn dat ze gemist worden in statistische analyse, maar ze kunnen dan toch de overleving in de winter significant beïnvloeden. Meenemen van overwintering is een onderdeel van de aanbevelingen voor veldstudies in de nieuwe EFSA guidance. De grote verschillen tussen de twee jaren in deze studie pleit er zelfs voor om meerdere jaren achter elkaar te testen, omdat anders effecten mogelijk gemist worden. Hoeveel jaar gemeten zou moeten worden, is echter niet bekend.

- *Studies over combinatie-effecten van bestrijdingsmiddelen met ziekten en plagen*

  - *Effect van de combinatie van imidacloprid en Nosema-infectie op honingbijen* Alaux et al. 2010
    Volgens de auteurs is aangetoond dat de interactie tussen microsporide parasieten en pesticiden niet alleen een hogere sterfte veroorzaakte maar ook mogelijk volken kan verzwakken. Alle testen zijn echter gedaan met kleine groepen bijen (30 of 120) en niet met hele volken, dus het effect op volkniveau moet nog onderzocht worden voor deze conclusie getrokken kan worden.

Uitgebreide samenvatting
In dit laboratoriumonderzoek zijn de effecten van de combinatie van imidacloprid (10 dagen blootstelling aan 0.7, 7 of 70 µg/kg in 50% suikersiroop) en Nosema-infectie (200.000 sporen/bij, een mix van *N.apis* en *N.ceranae*) getest op drie dingen: individuele gezondheid, individuele weerstand en kolonieweerstand. De geteste bijen waren een mix van *Apis mellifera ligustica* x *A.m.mellifera*, de typische bij in die regio in Zuid-Frankrijk. Beide blootstellingen gebeurden in kooitjes in het laboratorium en dus niet op volkniveau. Mortaliteit is duidelijk verhoogd bij de combinatie vergeleken met de controle of de afzonderlijke behandelingen. Er is ook meer suikeropname, dus hogere energiebehoefte. Voor de weerstandeffecten op individuniveau zijn stoffen gemeten die een rol spelen bij de afweer (THC, total haemocyte count; en phenoloxidase activiteit (PO), speelt een rol bij *encapsulating foreign objects*). Hier waren geen effecten van de behandeling, wel van leeftijd van de bijen (hoe ouder, hoe meer PO en hoe minder THC). Voor

sociale immuniteit is glucose oxidase (GOX) activiteit gemeten, zit in de *hypopharyngeal glands* (HPG), speelt een rol bij het aanmaken van antiseptische stoffen voor in larvevoedsel en honing, daarmee bij voedselsterilisatie en daarmee bij ziektepreventie. Bij de combinatiebehandeling was er significant minder GOX. De HPG was kleiner bij Nosema alleen en bij de combinatie dan in de controle en bij imidacloprid alleen. Volgens de auteurs is hiermee aangetoond dat de interactie tussen microsporide parasieten en pesticiden niet alleen een hogere sterfte veroorzaakte maar ook mogelijk volken kan verzwakken. Alle testen zijn echter gedaan met kleine groepen bijen (30 of 120) en niet met hele volken, dus het effect op volkniveau moet nog onderzocht worden voor deze conclusie getrokken kan worden.

- *Effect van bestrijdingsmiddelen in broedraten op de ontwikkeling van honingbijen* Wu et al. 2011
  De onderzoekers keken naar de ontwikkeling van bijen in, met oa neonicotinoiden, besmette raten in een kooitest en vonden een vertraging in de ontwikkeling en vroegere sterfte van volwassen bijen. Na meerdere broedcycli in deze raten traden meer effecten op. Het is niet mogelijk om de effecten aan één stof of zelfs een groep van stoffen te wijten gezien de cocktail aan stoffen die in de raten zat. Het is bovendien niet uit te sluiten dat de besmette raten meer pathogenen bevatten dan de controleraten. De studie keek niet naar effecten op hele volken op de langere termijn. Dit onderstreept het belang van een brede benadering van de problematiek. Een goede hygiëne in de bijenhouderij is een belangrijk middel om het broedsucces en overleving van bijenvolken te bevorderen.

Uitgebreide samenvatting

In dit artikel mat men residuen van bestrijdingsmiddelen in broedraten uit Noord-Amerikaanse bijenvolken. Imidacloprid, thiamethoxam en clothianidin werden elk gevonden in één van de 13 monsters, in respectievelijk 45, 38 en 35 ppb. Er zaten veel andere stoffen in de raten. Acariciden (gebruikt door imkers ter bestrijding van varroa) werden het vaakst aangetroffen. De onderzoekers keken naar de ontwikkeling van bijen in de besmette raten in een kooitest en vonden een vertraging in de ontwikkeling en vroegere sterfte van volwassen bijen. Na meerdere broedcycli in deze raten traden meer effecten op. Het is niet mogelijk om de effecten aan één stof of zelfs een groep van stoffen te wijten gezien de cocktail aan stoffen die in de raten zat. Het is bovendien niet uit te sluiten dat de besmette raten meer pathogenen bevatten dan de controleraten. De studie keek niet naar effecten op hele volken op de langere termijn. De belangrijkste boodschap van deze studie zou moeten zijn dat bijenhouders bij de vervanging van raten moeten zorgen dat deze schoon zijn.

- *Effect van imidacloprid op Nosema-infectie van honingbijen* Pettis et al. 2012
  In individuele bijen die als larve opgegroeid waren in een volk waar imidacloprid gevoerd werd, was de Nosema-infectie na kunstmatige besmetting in het laboratorium hoger. Er was echter geen dosis-responsrelatie (de infectiegraad in de hogere dosering was niet hoger dan in de lagere dosering). Ook werd in de behandelde volken geen hogere Nosemainfectiegraad gevonden. Naar de mening van Ctgb zou dit effect in een meer realistische blootstellingssetting onderzocht moeten worden voordat conclusies getrokken kunnen worden voor de risicobeoordeling. De gebruikte imidaclopriddoseringen en –blootstellingsduur zijn gekozen voor relevantie voor zaadbehandeling van bloeiend gewas, maar dat is momenteel niet toegestaan.

Uitgebreide samenvatting

In deze test zijn honingbijvolken (*Apis mellifera*, volken van 30-40.000 volwassen bijen) gevoerd met 0, 5 of 20 ppb imidacloprid in *protein supplement patties*. Na 5 en 8 weken blootstelling werden raten met uitkomend broed naar het lab gebracht. Net uitgekomen volwassen bijen werden in groepen van 30 in een kooitje gezet en gevoerd met een Nosemaoplossing tot een dosis van 333.333 sporen in twee dagen. In individuele bijen die als larve opgegroeid waren in een volk waar imidacloprid gevoerd werd, was de Nosema-infectie hoger. Er was echter geen dosis-responsrelatie (de infectiegraad in de hogere dosering was niet hoger dan in de lagere dosering). Ook werd in de behandelde volken geen hogere Nosema-infectiegraad gevonden. Dit effect zou in een meer realistische blootstellingssetting onderzocht moeten worden voordat conclusies getrokken kunnen worden voor de risicobeoordeling. De gebruikte imidaclopriddoseringen zijn bovendien hoger dan de residuen die we van zaadbehandeling met imidacloprid in het veld verwachten (maximaal gehalte in nectar/pollen opgegroeid uit behandeld zaad van 5 ppb (een conservatieve schatting) en een maximaal gehalte in volggewassen van 2 ppb). En de gebruikte Nosemadosering is erg hoog en op zichzelf uiteindelijk al dodelijk voor een bij.

- *Effect van fipronil en thiacloprid op Nosema-infectie in en sterfte van honingbijen.* Vidau et al. 2011

Na kunstmatige infectie met *Nosema ceranae* werden honingbijen in laboratoriumkooitjes twintig dagen lang blootgesteld aan fipronil of thiacloprid in een dagelijkse dosis van ongeveer 1/100 van de LD50.
Infectie met Nosema verhoogde de mortaliteit significant. Fipronil en thiacloprid alleen hadden geen effect op mortaliteit, maar in combinatie met Nosema versnelden zij het intreden van de dood en de hoogte van de mortaliteit zowel vergeleken met de controle als met Nosema alleen. Gedragseffecten (agressiviteit en tremoren, en later ataxia) traden alleen op bij de combinatiegroepen. Hoewel de effecten op bijen van de combinatiegroepen hetzelfde waren, verlaagde fipronil de sporenontwikkeling van Nosema terwijl thiacloprid deze juist verhoogde. De auteurs verklaren dit niet.
Dit kunstmatige infectie-experiment in het laboratorium zou herhaald moeten worden onder veldrealistische omstandigheden voor conclusies getrokken kunnen worden die in de risicobeoordeling gebruikt kunnen worden.

Uitgebreide samenvatting

Net uitgekomen volwassen *Apis mellifera mellifera* bijen (vrij van Nosema) werden blootgesteld aan *Nosema ceranae*, fipronil, thiacloprid, Nosema+fipronil of Nosema+thiacloprid. Doseringen waren 1 µg/L fipronil of 5.1 mg/L thiacloprid (gemeten blootstelling per dag: ~0.025-0.027 ng fipronil/bij/d en ~112-153 ng thiacloprid/bij/d, beide gedurende 20 dagen). A.s. blootstelling duurde 20 dagen en begon 10 dagen na kunstmatige infectie met 125.000 sporen/bij.
Bepaalde indicatoren van het detoxificatiesysteem werden gemeten (ECOD (7-ethoxycoumarin-O-deethylase) en GST (Glutathione-S-Transferase)). ECOD was niet beïnvloed door Nosema, maar GST activiteit was significant verhoogd in de Nosemagroep.
Infectie met Nosema verhoogde de mortaliteit significant. Fipronil en thiacloprid alleen hadden geen effect op mortaliteit (dit is te verwachten aangezien de dosering ongeveer 1/100 van de acute orale LD50 is), maar in combinatie met Nosema versnelden zij het intreden van de dood en de hoogte van de mortaliteit zowel vergeleken met de controle als met Nosema alleen. Met Nosema behandelde bijen namen vóór insecticideblootstelling significant meer sucrose op dan onbehandelde bijen. Toch was er later in de test blijkbaar geen verschil meer, aangezien er geen statistisch verschil was in insecticide-opname tussen de twee groepen. Gedragseffecten (agressiviteit en tremoren, en later ataxia) traden alleen op bij de combinatiegroepen. Hoewel de effecten op bijen van de combinatiegroepen hetzelfde waren, verlaagde fipronil de sporenontwikkeling van Nosema terwijl thiacloprid deze juist verhoogde. De auteurs verklaren dit niet.
Dit kunstmatige infectie-experiment in het laboratorium zou herhaald moeten worden onder veldrealistische omstandigheden voor conclusies getrokken kunnen worden die in de risicobeoordeling gebruikt kunnen worden.

- *Effect van thiacloprid op Nosema-infectie in en sterfte van honingbijen.* Retschnig et al. (2014)
  Al dan niet na kunstmatige infectie met *Nosema ceranae* werden honingbijen in laboratoriumkooitjes veertien dagen lang blootgesteld aan een hoge of lage dosering thiacloprid. De dagelijkse dosis thiacloprid per bij is niet berekend, maar het gehalte in de testvloeistof was twaalf of zes keer hoger dan in Vidau et al. 2011. Er was een significant synergistisch effect op mortaliteit bij de hoge thiaclopriddosering, maar niet bij de lage. Er werd een vermindering van het aantal Nosemasporen gevonden in thiaclopridbehandelde volken (geen relatie met de dosering) ten opzichte van onbehandelde volken. Deze resultaten zijn in tegenspraak met de bevindingen van Vidau et al. (2011).
  Ctgb merkt op dat de testomstandigheden mogelijk niet ideaal waren, aangezien zelfs in de controle slechts 20 van de 80 bijen de volle veertien dagen overleefden.
  Voor conclusies over mogelijk synergistische effecten van thiacloprid en Nosema getrokken kunnen worden, moet daar onderzoek in het veld naar plaatsvinden, aangezien de omstandigheden op volkniveau heel anders kunnen uitpakken voor een infectie dan bij individuele honingbijen in het lab, en ook gezien de tegenstrijdige resultaten van vergelijkbare onderzoeken in het lab.
  Verder lijken de gebruikte testconcentraties erg hoog. Het EASAC-rapport noemt een waarde van 0-199 ppb in koolzaadstuifmeel na zaadbehandeling, i.e. maximaal 0,199 ppm. Hogere waarden dan deze zijn Ctgb niet bekend. Er zijn echter waarschijnlijk geen metingen gedaan na spuitbehandeling. In Nederland is toepassing van thiacloprid op bloeiende gewassen momenteel toegestaan.

Uitgebreide samenvatting

Net uitgekomen *Apis mellifera carnica* werksters werden met 20 bij elkaar in kooitjes gezet en 14 dagen lang blootgesteld aan een lage of een hoge dosis thiacloprid in suikerwater, al dan niet in combinatie met

een initiële blootstelling aan de parasiet *Nosema ceranae*. 100,000 Nosemasporen per bij, 60 ppm = 70 mg/L of 30 ppm = 35 mg/L thiaclopid in 50% w/v sucroseoplossing. Per behandeling 4 kooitjes = 80 bijen. Er was geen effect op voedselopname. Op sterfte werd wel een significant effect gevonden: lager in de controle en hoger in de groep met 60 ppm thiacloprid + Nosema. De sterfte in deze groep was hoger dan die in de 60 ppm thiacloprid en in de Nosema groep opgeteld, een significant synergistisch effect. Bij 30 ppm werd geen synergistisch effect gevonden, wat in tegenspraak is met bevindingen van Vidau et al. (2011) die bij 5.1 ppm thiacloprid (en 125.000 sporen per bij, een zeer hoge dosering) dat al wél vond. Ook in contrast met Vidau et al. 2011 werd geen stimulatie, maar juist een vermindering van het aantal Nosemasporen gevonden in thiaclopridbehandelde volken (geen relatie met de dosering) ten opzichte van onbehandelde volken. Ctgb merkt op dat de testomstandigheden mogelijk niet ideaal waren, aangezien zelfs in de controle slechts 20 van de 80 bijen de volle veertien dagen overleefden. Verder lijken de gebruikte testconcentraties erg hoog. Het EASAC-rapport noemt een waarde van 0-199 ppb in koolzaadstuifmeel na zaadbehandeling, i.e. maximaal 0,199 ppm. Hogere waarden dan deze zijn Ctgb niet bekend. Er zijn echter waarschijnlijk geen metingen gedaan na spuitbehandeling. In Nederland is toepassing van thiacloprid op bloeiende gewassen momenteel toegestaan.
Voor conclusies over mogelijk synergistische effecten van thiacloprid en Nosema getrokken kunnen worden, moet daar onderzoek in het veld naar plaatsvinden, aangezien de omstandigheden op volkniveau heel anders kunnen uitpakken voor een infectie dan bij individuele honingbijen in het lab en gezien de tegenstrijdige resultaten van verschillende studies.

- *Effect op hommelvolken van thiamethoxam + clothianidin alleen of in combinatie met een darmparasiet.* Fauser-Mislin et al (2014) .
  Labonderzoek met kunstmatige infectie met de parasiet *Crithidia bombi* en negen weken lang blootstelling zowel in suikerwater als stuifmeel. De auteurs concluderen dat neonicotinoïden een duidelijk negatief effect hebben op de groei en fitness van hommelvolken, en dat andere parameters alleen effect laten zien bij de combinatie van de neonicotinoïden en de parasiet. Zij pleiten voor het opnemen in het toetsingskader van andere bijensoorten dan de honingbij, chronische tests op de hele levenscyclus en voor het opnemen van combinatie-effecten van gewasbeschermingsmiddelen en andere stressoren zoals parasieten. Ctgb kan hiermee instemmen. Met de nieuwe EFSA guidance voor bijen en met de ontwikkelingen op het gebied van combinatie-effecten zijn stappen hiernaartoe reeds gezet. Dit onderzoek geeft geen directe aanleiding tot ingrijpen in de huidige toelatingssituatie in Nederland, aangezien toepassing op in het veld bloeiende planten niet is toegestaan en zowel de gehaltes als de blootstellingsduur in deze studie dus onrealistisch hoog zijn. Bovendien betreft het labonderzoek en zouden deze effecten ook in het veld onderzocht moeten worden.

Uitgebreide samenvatting
Bombus terrestris volkjes (1 koningin en 10 werksters) werden in het lab blootgesteld aan één van vier behandelingen: P = infectie met de darmparasiet Crithidia bombi, N=blootstelling aan thiamethoxam en clothianidin, PN = combinatie van de voorgaande twee, en C=controle. In P en PN, de parasiet werd toegebracht bij de helft van de werksters. N en PN kregen negen weken lang zowel in suikerwater (35%, met gelijke aandelen glucose, fructose en saccharose) als in *pollen patties* (met twee-derde vers stuifmeel) met concentraties van 4 ug/kg (4ppb) thiamethoxam en 1.5 ug/kg (1.5 ppb) clothianidin. Tien volken per behandeling, alle veertig koninginnen waren zusters.
Volken die neonicotinoïden kregen, minderden eerder met werksterproductie en produceerden ook minder werksters dan C en P volken. Dit werd zichtbaar vanaf week 4. Ook leefden de werksters van deze volken minder lang, werd minder sexueel actief broed (koninginnen + darren) geproduceerd en minder darren (voor koninginnen alleen was het effect niet statistisch significant), en werd minder suikerwater (direct vanaf het begin van het experiment) en pollen (vanaf week 4) verzameld. Er was geen effect van de parasiet alleen op al deze parameters.
Koninginnen leefden significant korter in de NP volken dan in C.
P en NP volken waren voor vrijwel 100% geïnfecteerd met de parasiet. Er was hierbij geen effect van de neonicotinoiden te zien.
De auteurs concluderen dat neonicotinoïden een duidelijk negatief effect hebben op de groei en fitness van hommelvolken, en dat andere parameters pas effect laten zien bij de combinatie van neonicotinoïden en de parasiet . Zij pleiten voor het opnemen in het toetsingskader van andere bijensoorten dan de honingbij, chronische tests op de hele levenscyclus en voor het opnemen van combinatie-effecten van gewasbeschermingsmiddelen en andere stressoren zoals parasieten. Ctgb kan hiermee instemmen. Met de nieuwe EFSA guidance voor bijen en met de ontwikkelingen op het gebied van combinatie-effecten zijn stappen hiernaartoe reeds gezet. Dit onderzoek geeft geen directe aanleiding tot ingrijpen in de

huidige toelatingssituatie in Nederland, aangezien toepassing op in het veld bloeiende planten niet is toegestaan en zowel de gehaltes als de blootstellingsduur in deze studie dus onrealistisch hoog zijn.

- *Effect van clothianidin en imidacloprid op immuunsysteem van honingbijen* (Di Prisco et al. (2013)
  De auteurs vinden voor de twee neonicotinoïden een negatieve werking op de immuunrespons en een verhoogde vermeerdering van het deformed wing virus. Volgens de auteurs gebeurt dit al bij veldrelevante, subletale doseringen. De gebruikte doseringen zitten echter veelal dicht bij de LD50 die voor de twee stoffen op EU-niveau zijn vastgesteld. Clothianidin en imidacloprid zijn bovendien momenteel niet toegelaten in Europa in bij-aantrekkelijke gewassen, waardoor deze gehaltes nu niet veld-relevant zijn. Verder zijn de onderzoeken gedaan in het laboratorium. De effecten zouden ook in een veldsituatie (met hele bijenvolken) onderzocht moeten worden.

Uitgebreide samenvatting

Deze publicatie beschrijft een onderzoek naar de werking van een bepaald onderdeel van het immuunsysteem van honingbijen *(Apis mellifera ligustica)* na blootstelling aan clothianidin of imidacloprid. De testvloeistof werd met een micropipet op de thorax aangebracht. Concentraties waren 10, 20, 30, 40 en 50 ng/bij clothianidin; 2,5, 5, 10, 20, 30, 40 en 50 ng/bij imidacloprid; 15, 30, 60, 125, 250, 350, en 500 ng/bij chloorpyrifos. De auteurs vinden voor de twee neonicotinoïden, maar niet voor chloorpyrifos, een negatieve werking op de immuunrespons en een verhoogde vermeerdering van het deformed wing virus. Volgens de auteurs gebeurt dit al bij veldrelevante, subletale doseringen. De gebruikte doseringen zitten echter veelal dicht bij de LD50 die voor de twee stoffen op EU-niveau zijn vastgesteld. Clothianidin en imidacloprid zijn bovendien momenteel niet toegelaten in Europa in bij-aantrekkelijke gewassen, waardoor deze gehaltes niet veld-relevant zijn. Verder zijn de onderzoeken gedaan in het laboratorium. De effecten zouden ook in een veldsituatie (met hele bijenvolken) onderzocht moeten worden. Hoewel de relevantie voor de huidige toelatingssituatie in Nederland laag is (geen direct ingrijpen nodig in lopende toelatingen), geeft dit artikel nuttige informatie over de mogelijke manieren waarop een bestrijdingsmiddel invloed kan hebben op het vermogen van een organisme zich te wapenen tegen ziektes en plagen. Dit soort indirecte effecten is mogelijk ook voor veel andere stoffen en organismen relevant, maar is momenteel geen onderdeel van het toetsingskader. Het verdient aanbeveling hier methodiek voor te ontwikkelen zodat dit in de toekomst wel meegenomen kan worden in de risicobeoordeling van gewasbeschermingsmiddelen, in een breder kader (en niet specifiek gericht op honingbijen en neonicotinoïden).

- *Beschrijving van functioneel kader voor stressoren* Nazzi & Pennacchio (2014).

De auteurs beschrijven een functioneel kader om het mogelijke samenwerken van verschillende stressoren (ziekten en plagen, voedselgebrek, bestrijdingsmiddelen etc) op de gezondheid van de honingbij te interpreteren. Het artikel bevat geen nieuw onderzoek en levert als zodanig geen nieuwe eindpunten voor een risicobeoordeling. Het is nuttig bij het ontwikkelen van toetsingskader dat combinaties van stressoren meeneemt. EFSA is hier inmiddels mee begonnen.

- *Effect van imidacloprid of clothianidin op honingbijvolken.* Lu et al. 2014

Deze studie wordt twee maal genoemd in het EASAC-rapport. Hij is in de vorige sectie reeds besproken.

- *Review van effecten van neonicotinoïden op niet-doelwit organismen.* Mason et al. 2013

Dit betreft een review, dus zonder nieuw onderzoek. De auteurs formuleren de hypothese dat de achteruitgang van allerlei groepen organismen (bijen, waterleven, amfibieën, vleermuizen en vogels) te wijten is aan de weerstandsverlaging die veroorzaakt wordt door neonicotinoïden en fipronil. Het onderbouwend onderzoek dat zij aanhalen betreft vooral labstudies en is voornamelijk gedaan aan bijen en vissen. Voor de andere groepen is er geen experimenteel bewijs. De informatie in dit review kan meegenomen worden bij het ontwikkelen van toetsingskader voor een risicobeoordeling met meerdere stressoren.

- Szczepaniec et al. 2013
  Dit artikel gaat niet over bijen en wordt daarom niet in dit hoofdstuk behandeld.

- *Effect op honingbijen van thiacloprid+tau-fluvalinaat alleen of in combinatie met een darmparasiet.* *Retschnig et al. 2015*[10] *(niet in EASAC-rapport want later gepubliceerd)*
  Deze studie vond verhoogde sterfte bij honingbijen na zes weken kunstmatige blootstelling in het volk aan 611,5 ppb thiacloprid en gelijktijdige blootstelling aan tau-fluvalinaat. De blootstelling in deze studie is hoger dan verwacht voor zaadbehandeling van thiacloprid. Thiacloprid mag in Nederland ook op andere manieren, zoals bespuiting, toegepast worden op bloeiende gewassen. De hoogte van het residu in nectar en stuifmeel na andere toepassingsmethoden is niet bekend. De relevantie van de blootstellingshoogte in de studie van Retschnig et al. 2015 voor de Nederlandse praktijksituatie is daarmee onduidelijk. De verhoogde sterfte werd gevonden terwijl thiacloprid tegelijk met Apistan werd toegepast, een varroabestrijdingsmiddel op basis van tau-fluvalinaat. De effecten van thiacloprid alléén zijn niet onderzocht. Nederlandse imkers wordt aangeraden alleen oxaalzuur, mierenzuur en thymol toe te passen als varroabestrijding, en landbouwacariden (zoals tau-fluvalinaat) niet te gebruiken[11]. Voor de Nederlandse situatie is het combinatie-effect dus van geringe relevantie. Aangezien deze studie verder géén synergistisch effect vindt van thiacloprid en Nosema, in tegenstelling tot sommige laboratoriumstudies (zie hierboven), geeft hij naar de mening van Ctgb momenteel geen aanleiding tot ingrijpen in de toelatingen van thiacloprid.

Uitgebreide samenvatting

De studie is uitgevoerd op twee locaties, in Zwitserland en Duitsland.

Vier volken die buiten stonden en vrij konden foerageren werden zes weken lang blootgesteld aan thiacloprid (1 kg sucroseoplossing per week in het volk met 611,5 ppb thiacloprid (gemeten)) en tau-fluvalinate (via Apistan strips in het volk, volgens de normale manier van Varroamijtbestrijding: 0,8 g a.s./strip, 2 strips/volk). Vier andere volken werden blootgesteld aan onbehandelde sucroseoplossing. Na deze zes weken werden werksters van dezelfde leeftijd verzameld en gebruikt voor experimenten. Deze vonden deels plaats op een andere locatie, 300 km verderop. De helft van de werksters werden geënt met *Nosema ceranae* via opname van een sucroseoplossing: ~ 100 000 sporen per bij, de andere helft kreeg onbehandeld voedsel.

Zo ontstonden vier testgroepen: controle, bestrijdingsmiddel, parasiet, en bestrijdingsmiddel+parasiet, met 198 individuele bijen per testgroep. Deze bijen werden gemerkt en in kleine 'observatievolken' geplaatst, onbehandelde volken die dienden als omgeving om de behandelde bijen te kunnen observeren op sterfte en gedrag (gedurende twee weken), Nosema infectiegraad (na twee weken, bij 16-28 overlevende werksters per testgroep), vliegactiviteit (dag 7 t/m 13 na introductie in de observatievolken, gemeten als aantal vluchten per minuut).

Op locatie A was mortaliteit bij bijen behandeld met bestrijdingsmiddelen significant hoger dan de controle. De sterfte na 14 dagen was tussen de ~40 en ~55% (alle groepen). Op locatie B was mortaliteit niet significant beïnvloed, met sterfte na 14 dagen ~65%. In alle groepen hadden bijen van locatie B significant hogere sterfte dan van locatie A.

Bijen behandeld met Nosema waren significant vaker inactief dan controlebijen, onafhankelijk van bestrijdingsmiddel. Er was geen verschil op vliegactiviteit, behalve dat met Nosema behandelde bijen een hogere vliegactiviteit hadden dan met bestrijdingsmiddel behandelde bijen.

Residuen van thiacloprid en thau-fluvalinaat, gemeten in de sucroseoplossing en in honing, was en stuifmeel, bevestigden de blootstelling. In de controlevolken werd ook wat thiacloprid aangetroffen, in lagere concentraties (4% vergeleken met de behandelde groep in honing, 5% in stuifmeel, 23% in was). De controlebesmetting wordt verklaard met drift van bijen tussen volken of omgevingsbesmetting.

Het aantal Nosemasporen in met Nosema behandelde bijen was niet verschillend tussen de met bestrijdingsmiddel behandelde en onbehandelde groep. Wel hadden met Nosema behandelde bijen significant meer sporen dan niet met Nosema geënte bijen, hoewel een deel van deze niet geënte bijen toch een hoog sporenaantal droeg. Dit wordt verklaard met besmetting via materiaal in het volk.

Het feit dat de effecten van de stressoren op mortaliteit niet consistent waren tussen de locaties, wijst er volgens de auteurs op dat deze effecten zwak zijn; sterke effecten zijn over het algemeen goed reproduceerdbaar. Desalniettemin was het op één van de twee locaties zo dat de blootstelling aan de bestrijdingsmiddelen in het larvale stadium zorgde voor verhoogde sterfte van uitgekomen werksters. De auteurs pleiten voor meer onderzoek naar de invloed van de locatie op stressor-bijen-onderzoek.

Omdat de twee bestrijdingsmiddelen niet apart getest zijn, is er niets te zeggen over de mogelijke combinatie-effecten van de twee stoffen. In deze studie werd geen effect gevonden van Nosema op

---

[10] Retschnig, G., Williams, G.R., Odemer, R., Boltin, J., Di Poto, C., Mehmann, M.M., Retschnig, P., Winiger, P., Rosenkranz, P., Neumann, P. (2015) Effects, but no interactions, of ubiquitous pesticide and parasite stressors on honey bee (Apis mellifera) lifespan and behaviour in a colony environment. Environmental Microbiology, in press

[11] Effectieve bestrijding van varroa, bijen@wur, 2013. http://edepot.wur.nl/292797.

werkstersterfte of vliegactiviteit. Nosema had alleen tot gevolg dat iets meer werksters inactief gedrag vertoonden. In sommige andere studies is wel verhoogde sterfte gevonden, wat de auteurs verklaren door een mogelijk verschil in virulentie tussen *Nosema ceranae* stammen, of in gevoeligheid van bijen tussen geografische regio's.
In tegenstelling tot andere onderzoeken vond deze studie geen synergistische effecten tussen Nosema en neonicotinoïden. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat blootstelling aan de ene stressor (de bestrijdingsmiddelen) en de observaties aan de bijen op volkniveau gebeurden, terwijl de meeste onderzoeken naar (interacties tussen) stressoren in het lab plaatsvinden.
Deze studie vond verhoogde sterfte bij honingbijen na zes weken kunstmatige blootstelling in het volk aan 611,5 ppb thiacloprid bij gelijktijdige blootstelling aan tau-fluvalinaat. Voor thiacloprid zijn alleen gemeten residuen aanwezig in koolzaadstuifmeel na zaadbehandeling: range 0-199 ppb (bron: EASAC-rapport). Vergeleken hiermee is de blootstelling in deze studie erg hoog. Thiacloprid mag in Nederland ook op andere manieren, zoals bespuiting, toegepast worden op bloeiende gewassen. De hoogte van het residu in nectar en stuifmeel na andere toepassingsmethoden is niet bekend. De relevantie van de blootstellingshoogte in de studie van Retschnig et al. 2015 is daarmee onduidelijk. De verhoogde sterfte werd gevonden terwijl thiacloprid tegelijk met Apistan werd toegepast, een varroabestrijdingsmiddel op basis van tau-fluvalinaat. De effecten van thiacloprid alléén zijn niet onderzocht. Nederlandse imkers wordt aangeraden alleen oxaalzuur, mierenzuur en thymol toe te passen als varroabestrijding, en landbouwacariden (zoals tau-fluvalinaat) niet te gebruiken[12]. Voor de Nederlandse situatie is het combinatie-effect dus van geringe relevantie. Aangezien deze studie verder géén synergistisch effect vindt van thiacloprid en Nosema, in tegenstelling tot sommige laboratoriumstudies (zie hierboven), geeft hij naar de mening van Ctgb momenteel geen aanleiding tot ingrijpen in de toelatingen van thiacloprid.

- *Overige studies*

  - Hopwood et al. (2012)

  Review, hier alleen aangehaald om de bron van de residugehaltes die in het EASAC-rapport worden genoemd, te duiden. Hopwood et al. 2012 wordt niet in detail door Ctgb besproken

De hoogste concentraties in nectar en pollen die in het EASAC-rapport worden genoemd, werden gevonden bij toepassing van imidacloprid in pompoen als de helft van de dosering (5.25 oz/acre) via het *transplant water* werd toegediend en de andere helft (ook 5.25 oz/acre) als drip irrigatie tijdens de bloei (Dively & Hooks 2010[13], de volledige referentie wordt hier gegeven omdat deze ontbreekt in het EASAC-rapport); deze geplitste toediening leidde tot hogere contraties dan een enkele toediening van 10.5 oz/acre).
In siergewassen werden na drenching ook hoge concentraties gevonden van imidacloprid, zes maanden (bij *Rhododendron*), achttien maanden (bij de struik *Amelanchier*) of zeventien maanden (in *Cornus mas*) na soil drenching; en imidacloprid werd 3-6 jaar na toepassing nog in 19 ppb gevonden in Rhododendron (Doering et al. 2004, 2004b[14], 2004c[15], 2005a[16], 2005b[17]). Gehaltes zijn soms een jaar na toepassing hoger dan twee weken na toepassing. Residuen in de bloemen worden gepresenteerd, niet in stuifmeel of nectar, wat mogelijk een vertekend beeld geeft. Het feit dat zo lang na toepassing er nog steeds hoge residuen in de bloemen van deze struiken gevonden worden geeft aan dat er mogelijk een verschil is tussen de opname en persistentie van imidacloprid (en mogelijk ook andere stoffen) in houtige gewassen en in kruiden. De specifieke toepassingen die in de studies onderzocht zijn, zijn niet relevant voor de huidige Nederlandse toelatingssituatie.

---

[12] Effectieve bestrijding van varroa, bijen@wur, 2013. http://edepot.wur.nl/292797.
[13] Dively & Hooks, 2010. Use patterns of neonicotinoid insecticides on cucurbit crops and their potential exposure to honey bees. Progress Report, Strategic Agricultural Initiative Grants Program, EPA Region III.
[14] Doering, Maus & Schoening. 2004b. Residues of Imidacloprid WG 5 in blossom samples of *Rhododendron* sp. after soil treatment in the field. Application: Autumn 2003, Sampling: 2004." Bayer CropScience AG. Report No. G201820.
[15] Doering, Maus & Schoening. 2004c. Residues of Imidacloprid WG 5 in blossom samples of *Rhododendron* sp. (variety Nova Zembia) after soil treatment in the field. Application: 2003, Sampling: 2003 and 2004." Bayer CropScience AG. Report No. G201806.
[16] Doering, Maus & Schoening. 2005a. Residues of Imidacloprid WG 5 in blossom and leaf samples of *Amelanchier* sp. after soil treatment in the field. Application: 2003, Sampling: 2004 and 2005." Bayer CropScience AG. Report No. G201799.
[17] Doering, Maus & Schoening. 2005b. Residues of Imidacloprid WG 5 in blossom samples of *Cornus mas* after soil treatment in the field. Application: 2003, Sampling: 2005." Bayer CropScience AG. Report No. G201801.

Niet-doelwit arthropoden (andere dan bijen en hommels)
In dit hoofdstuk wordt ingegaan op de in de hoofdstukteksten van het EASAC-rapport genoemde en besproken openbare-literatuurartikelen die betrekking hebben op andere niet-doelwitarthropoden dan bijen en hommels. Per artikel is bekeken wat de relevantie is voor de bestaande toelating(en) van middelen in Nederland met desbetreffende stof(fen), dat wil zeggen:

- als er effectconcentraties (eindpunten) zijn genoemd in het artikel zijn deze vergeleken met de door Ctgb gehanteerde toelatingsnormen (EU List of endpoints), of:
- als er effectpercentages bij een bepaalde testdosering zijn genoemd in het artikel zijn deze vergeleken met de door Ctgb toegelaten doseringen volgens het WG

- er is gekeken of de genoemde effecten binnen of buiten het toetsingskader vallen
- er is gekeken naar de grootte en mate van zekerheid van optreden van een risico

Het EASAC-rapport legt de nadruk op negatieve effecten op predatore en/of parasitoide arthropoden vanwege hun belang in de landbouw als natuurlijke plaagbestrijders. In het rapport wordt benadrukt dat predatore en/of parasitoide arthropoden ook via nectar en pollen en plantmateriaal blootgesteld kunnen worden aan neonicotinoiden, omdat ze vaak niet 100% carnivoor zijn maar ook omnivoor, bijvoorbeeld wanneer prooisoorten schaars zijn of wanneer ze zich in specifieke levensstadia bevinden. In dit verband worden in hoofdstuk '4.5.3 Agricultural ecosystem effects' en 'Annex A4.4 Effects on natural predators' specifiek de onderstaande publicaties genoemd waarin negatieve effecten van neonicotinoiden op andere arthropoden dan bijen en hommels zijn gevonden.

Aangezien in het EASAC-rapport alleen de negatieve effecten worden benoemd, maar niet de blootstellingsconcentraties waarbij deze effecten optraden danwel duidelijke eindpunten (EC50, NOEC), is hieronder per publicatie dieper ingegaan op deze aspecten, zodat een vergelijking met de in Nederland toegelaten neonicotinoiden bevattende middelen kan worden gemaakt en een inschatting van het risico.

- *Artikelen uit hoofdstuk Effects on natural predators*

Pisa et al (2015)- review
Dit review wordt aangehaald in het EASAC-rapport ter illustratie van diverse negatieve effecten op diverse arthropoden, met name predatore soorten die belangrijk zijn als natuurlijke vijanden van plaagsoorten. Onder verwijzing naar het review van Pisa et al (2015) noemt het EASAC-rapport een reeks van taxonomische arthropodengroepen waarvoor negatieve effecten zijn gevonden. De volgende artikelen uit het review van Pisa et al (2015) zijn specifiek besproken in het EASAC-rapport: Albajes et al (2003) and Kilpatrick et al (2005). Deze twee artikelen zijn hieronder nader geanalyseerd.

Albajes et al (2003): Volgens het EASAC-rapport werden in deze studie negatieve effecten op abundantie van Staphylinidae (kortschildkevers) en Heteroptera (wantsen) gevonden bij vergelijking tussen maisvelden ingezaaid met imidacloprid behandeld maiszaad en onbehandeld mais. Er werden geen negatieve effecten gevonden op abundantie van Carabidae (loopkevers) en Coccinellidae (lieveheersbeestjes). De mate van effect of de blootstelling waarbij het effect optrad worden verder niet genoemd in het EASAC-rapport.

Nadere bestudering van het artikel laat zien dat het om een 5 jaar durende studie in mais gaat in Spanje (1997-2001). Het mais werd jaarlijks ingezaaid en behandeld met Gaucho 35 FS met 4.9 g a.s./kg zaad. De studie was gericht op predatore bodemfauna en bemonstering vond plaats met ingegraven bodemvallen en visuele sampling. Het doel van de studie was om vast te stellen of zaaien van imidacloprid behandeld zaad negatieve effecten had op de aanwezige predatore fauna (wat op zijn beurt weer toenemend effect zou kunnen hebben op de plaagdruk van kevers en rupsen).

In de studie werd een negatief effect op Heteroptera (wantsen) gevonden (visuele sample methode): in de eerste 2 van de 5 studiejaren was de abundantie in de onbehandelde plots hoger dan in de behandelde (sign. $p<0.05$) met een overall gemiddelde van 25% hogere abundantie in de onbehandelde plots. Na de eerste 2 jaar was er geen significant verschil meer.
In de pitfalls werd een significant overall negatief effect op Staphylinidae (kortschildkevers) gevonden (geen effectpercentage gerapporteerd, maar uit de tabellen blijkt een maximaal effect van 35% in een van de jaren). Op geen van de andere taxonomische groepen werd een significant effect gevonden.

Bovengenoemde effecten vallen binnen het toetsingskader en zouden meegenomen kunnen worden bij een middeltoelating. Wel zal eerst het artikel geevalueerd moeten worden op wetenschappelijke betrouwbaarheid. Het is met name de vraag of de visuele sample methode voldoende betrouwbaar wordt bevonden, en of de achterliggende statistiek betrouwbaar is.

Ook hangt de relevantie van de studie af van het gewas waarin deze is uitgevoerd. Er is geen imidacloprid behandeld mais toegelaten in Nederland. Er kan wel gekeken worden naar de relevantie van de gebruikte dosering in de studie voor de in Nederland toegelaten zaadbehandelingsmiddelen op basis van imidacloprid. Uitgaande van een gemiddelde zaaidichtheid van 30 kg mais/ha (Ctgb expert judgement; gebaseerd op bekende GAP's) komt de dosering in de studie neer op 147 g a.s./ha. In Nederland wordt Gaucho tuinbouw gebruikt in de bedekte opkweek van o.a. sla met daarna uitplanten volvelds; de dosering in kg a.s./ha volgens GAP is maximaal 120 g a.s./ha. Sombrero is toegelaten als zaadbehandeling in bieten bij een maximale dosering van 120 g a.s./ha. De in Nederland toegelaten zaadbehandelingsdoseringen met imidacloprid zijn dus lager dan de in de studie gebruikte dosering.

Gezien het feit dat in Nederland geen imidacloprid behandeld mais is toegelaten, dat in de wel toegelaten zaadbehandelingsmiddelen met imidacloprid een lagere dosering per hectare is voorgeschreven dan in de studie is gebruikt, samen met het feit dat in de studie de effecten niet zeer sterk waren (rond de 30%, wat in veldstudies al vaak de grens is van statistisch aantoonbare effecten), wordt geconcludeerd dat het artikel van Albajes et al (2003) niet voldoende aanleiding geeft om de in Nederland toegelaten zaadbehandelingsmiddelen op basis van imidacloprid te herbeoordelen.

Kilpatrick et al (2005):
In de studie werd het effect van acetamiprid, thiamethoxam en imidacloprid (en dicrotophos, deze stof wordt hieronder niet verder besproken) onderzocht op met name predatore arthropoden na bespuiting van katoenvelden in de VS (in 2002-2003), om de potentiele economische schade van negatieve effecten van deze middelen op natuurlijke vijanden (predatore arthopoden) te bepalen. Thiamethoxam veroorzaakte een negatief effect op de roofwants *Geocoris punctipes* en de rode vuurmier *Solenopsis invicta*. De drie neonicotinoiden veroorzaakten geen mortaliteit bij spinachtigen (Arachnida). De overall abundantie van predatore arthropoden gepooled over 5 studies lieten een negatief effect zien van 55-60% voor thiamethoxam en 30% voor acetamiprid en imidacloprid. De met thiamethoxam behandelde plots hadden een verhoogde plaagdruk door rupsen ten opzichte van de controle plots, wat in verband stond met verlaagde predatoren abundantie.
De neonicotinoiden werden verspoten met een dosering van 0.05 kg a.s./ha. Het aantal toepassingen varieerde tussen 1 en 2 voor thiamethoxam en acetamiprid en tussen 1 en 3 voor imidacloprid. De effecten op de predatore arthropodenfauna verschilden niet significant tussen de enkelvoudige of meervoudige toepassingen.

In Nederland is er 1 gewasbehandelingsmiddel op basis van thiamethoxam toegelaten, namelijk Actara. Het middel is toegelaten in diverse gewassen, bedekte en onbedekte teelt, met een reeks aan restricties in verband met bijen (driftreductie, bloeiend-onkruidvrije zones, wachttijden voor bij-aantrekkelijke volggewassen). De driftreducerende maatregelen en bloeiend-onkruidvrije zones zullen ook beschermend werken voor de off-field predatore arthropoden. De hoogst toegelaten doseringen in volveldsteelt zijn: in aardappels 2x 0.02 kg a.s./ha, en in boomkwekerij- en bloemisterijgewassen 3x0.025 kg a.s./ha. Deze doseringen zijn lager dan de maximaal geteste dosering in Kilpatrick et al (2005) (2x 0.05 kg a.s./ha).

Gezien het feit dat:
- de studie is gebaseerd op een gewassituatie die niet in Nederland voorkomt, namelijk katoen, en
- in de studie geen herstelperiode is bepaald, en
- voor het in Nederland toegelaten gewasbehandelingsmiddel met thiamethoxam (Actara) een lagere dosering per hectare is voorgeschreven dan in de studie is gebruikt, en
- in het dossier voor Actara meerdere arthropodenveldstudies zijn meegenomen met meer relevante dosering en veldsituatie,

geeft het artikel van Kilpatrick et al (2005) niet voldoende aanleiding om het in Nederland toegelaten gewasbehandelingsmiddel op basis van thiamethoxam te herbeoordelen.

Voor acetamiprid en imidacloprid geldt dat de in Nederland toegelaten doseringen hoger zijn dan de in de studie gebruikte dosering. Het gaat daarbij om een factor van max. 4.5 en 2 voor acetamiprid en imidacloprid resp. (gewasbehandeling).
Gezien het feit dat de studie is gebaseerd op een gewassituatie die niet in Nederland voorkomt, namelijk katoen, en gezien het feit dat in de studie de effecten niet zeer sterk waren (rond de 30%, wat in veldstudies al vaak de grens is van statistisch aantoonbare effecten), en in de studie geen herstelperiode is bepaald, wordt geconcludeerd dat het artikel van Kilpatrick et al (2005) niet voldoende aanleiding geeft om de in Nederland toegelaten gewasbehandelingsmiddelen op basis van acetamiprid en imidacloprid te herbeoordelen.
Andere artikelen uit het review van Pisa et al (2015), ingedeeld per taxonomische groep (NB: dit is geen volledig overzicht van alle artikelen uit het review).

- Vlinders en motten (Lepidoptera)
Er zijn weinig specifieke toxiciteitsstudies met pesticiden en non-target Lepidoptera, daarentegen zijn er wel veel studies naar effecten op vlinders en motten die in de landbouw als plaagorganismen worden beschouwd. Het review noemt de volgende LC50-waarden voor acetamiprid uit studies van *Doffou et al (2011a,b)* voor de volgende als plaag beschouwde soorten:
- *Pectinophora gossypiella*: LC50 11049 ppm
- *Cryptophlebia leucotreta*: LC50 3798 ppm
- *Cydia pomonella* 'first instar' rupsen: LC50 0.84 ppm
- *Cydia pomonella* 'fifth instar' rupsen: LC50 114.78 ppm

Aangezien de bovenstaande 3 soorten worden bestreden als plaagorganismen, is het niet van toepassing om te bepalen of met het niet meenemen van deze gegevens een risico wordt onderschat in de huidige toelatingen van acetamiprid, aangezien de risicobeoordeling wordt gebaseerd op effecten op niet-doelwitsoorten.

Dilling (2009) In het review worden op basis van een studie van Dilling (2009) negative effecten op Lepidoptera larven in de bodem genoemd, naast een overall afname van abundantie en soortenrijkdom van diverse (bodem-)insecten, als gevolg van bodembespuiting met imidacloprid. Nadere bestudering van Dilling (2009) laat zien dat de bodembespuiting is uitgevoerd bij extreem hoge dosering: er is gespoten met 1.5 g imidacloprid per 2.5 cm dbh[18]. Omgerekend naar kg a.s. per ha is dit 30550 kg a.s./ha. Dit is een extreem hoge dosering en het is mogelijk dat het hoofdstuk 'Materiaal en methoden' in het artikel niet volledig heeft beschreven hoe de testdosering is toegepast; op basis van de beschrijving is dit echter de enige blootstelling per oppervlakte eenheid die afgeleid kan worden uit de tekst. Een dermate hoge dosering is niet toegelaten in Nederland. Voor imidacloprid is er 1 toepassing als bodembehandeling toegelaten (Potatoprid; in-furrow bespuiting in pootaardappelen), met een eenmalige dosering van 0.18 kg a.s./ha. Op basis van het bovenstaande kan geconcludeerd worden dat het artikel geen aanleiding geeft tot herbeoordeling van de in Nederland toegelaten middelen met imidacloprid.

Op basis van o.a. het artikel van Dilling (2009) benoemt het review van Pisa et al. (2015) verder de noodzaak voor meer onderzoek naar effecten van bestrijdingsmiddelen, waaronder neonicotinoiden, op vlinders en motten, en dan met name de niet als landbouwkundige plaag beschouwde soorten, waarbij alle levensstadia zouden moeten worden onderzocht (i.e. ei, larf, pop, adult). Ook worden de mogelijke negatieve effecten van blootstelling van Lepidoptera larven en rupsen in de bodem benadrukt.

Op dit moment is er geen expliciet data requirement voor studies naar toxiciteit voor Lepidoptera maar wordt aangenomen dat deze groep beschermd wordt door de getrapte risicobeoordelingsmethodiek voor niet doelwit-arthropode (i.e. de twee indicatorsoorten in de eerste tier (een roofmijt en een sluipwesp) zijn ook beschermend voor vlinders). In de recent verschenen EFSA-opinie ' EFSA PPR Panel, 2015. Scientific Opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for non-target arthropods. EFSA Journal 2015;13(2):3996, 212 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.3996' wordt echter voorgesteld om in de eerste tier een orale toxiciteitstest met Lepidoptera larven op te nemen. Het belang van vlinders en het feit dat deze groep mogelijk onderbelicht is in de huidige risicobeoordeling voor niet-doelwitarthropoden wordt dus onderkend door EFSA en de bovengenoemde EFSA Opinie zal

[18] Dbh (diameter at breast height) is een maat gebruikt in de bosbouw en kan worden omgerekend naar m2 met de volgende formule: BA (basal area tree trunk (in m^2))= 0.00007854x dbh^2 (gebaseerd op Wikipedia)

uitgangspunt zijn bij de revisie van het Guidance document on Terrestrial ecotoxicology (eindversie verwacht in 2018).

- Andere invertebraten - algemeen
Peck (2009b): In het review wordt een studie van Peck (2009b) besproken waarin een 3 jaar durende behandeling met (o.a.) imidacloprid van grasvelden in de V.S. ter bestrijding van keverlarven (engerlingen) resulteerde in een statistisch significante afname in abundantie van 54-62% gedurende de gehele studieduur voor:
- Hexapoden als totale groep (i.e.: insecten, spingstaarten (Collembola), dubbelstaarten (Diplura) en oerinsecten of poottasters (Protura));
- tripsen (Thysanoptera);
- adulte kevers (Coleoptera).

Er werden geen effecten gevonden op mijten, Hymenoptera (vliesvleugeligen), Hemiptera (halfvleugeligen), Coleoptera larven (keverlarven) en Diptera (tweevleugeligen).
Bepaling van het effect op de doelsoort (engerling) was niet mogelijk gezien de lage abundantie van deze groep op de studielocatie. Naast imidacloprid werden ook behandelingen uitgevoerd met trichlorfon, halofenozide, entomopathogene nematoden en sulfur. Geen van deze behandelingen liet een significant effect zien.
In de studie werd imidacloprid (Merit 0.5G) gedurende 3 jaar 1x per jaar verspoten met een dosering van 0.37 kg a.s./ha. Bemonstering vond plaats via uitgestoken bodemcylinders (*soil cores)*. Na toepassing zou moeten worden beregend, maar de natuurlijke regenval na de bespuiting was voldoende.
In Nederland is er 1 middel op basis van imidacloprid toegelaten in gras: het middel Merit Turf is toegelaten in sportvelden, inclusief golfterrein (tees, greens en/of fairways) en graszodenteelt. Het gaat om korrels die direct beregend moeten worden, bij een dosering van 30 kg middel/ha (0.15 kg a.s./ha), maximaal 1x/jaar. In het dossier van merit Turf zit geen veldstudie met (bodem-)arthropoden; er werd voldaan aan de norm op basis van laboratoriumgegevens. Aangezien de studie van Peck is uitgevoerd bij een dosering die 2.5x hoger ligt dan de in Nederland maximaal toegelaten dosering, is er geen aanwijsbaar risico voor de Nederlandse toelating dat met deze studie over het hoofd is gezien. De studie geeft niet voldoende aanleiding om de bestaande toelating te herbeoordelen.
Voor eventuele toekomstige toelatingen van imidacloprid in grasvelden bij hogere doseringen is de studie wel relevant. Als deze situatie zich voordoet, zal de studie door het Ctgb worden geevalueerd en meegenomen in de risicobeoordeling.

- Vliesvleugeligen (Hymenoptera) (oa. (parasitaire-)wespen, mieren); exclusief bijen en hommels
Stapel et al (2000): In het review wordt een studie van Stapel et al (2000) besproken, waarin subletale effecten op de parasitoide wesp *Microplitis croceipes* (schildwesp) zijn onderzocht via blootstelling aan extraflorale nectar van bloeiende katoenplanten die bespoten waren met imidacloprid. De twee subletale effecten die werden onderzocht waren:
- prooizoeksucces (host foraging ability), gemeten als vliegrespons na blootstelling aan prooigeuren in een windtunnel (d.m.v. benedenwinds geplaatste door rupsen aangevreten katoenbladeren)
- levensduur (longevity)

De gemeten effecten waren:
- Een afname van vliegrespons van 55.7% tov de controle (sign. $P<0.05$) na blootstelling aan nectar verzameld uit planten die 2 dagen daarvoor met imidacloprid waren bespoten. Zes dagen na de behandeling was het effect niet meer significant (effectpercentages gelijk aan of hoger dan de controle).
- De levensduur van wespen was significant lager dan de controle voor wespen blootgesteld aan nectar verzameld uit planten die 4 -10 dagen of langer daarvoor met imidacloprid waren bespoten (6.5- 4 dagen korter dan de controle-levensduur (19 d)). Er was niet genoeg nectar om te onderzoeken wanneer het effect niet meer zou optreden.

Het is van belang om te weten bij welke blootstelling deze effecten precies werden gevonden, om een zinvolle inschatting van het risico te kunnen maken. In de studie werd per katoenplant 5 mL testoplossing met 190 mg imidacloprid/L verspoten, wat neerkomt op 0.95 mg/plant. In Nederland vindt geen katoenteelt plaats maar om toch een vergelijking te kunnen maken is gekeken naar de gebruiksvoorschriften van de in Nederland toegelaten gewasbehandelingen met het middel Admire. Hiervoor is in appel en peer de concentratie imidacloprid in de spuitvloeitsof 70 mg/L, in bollen (vermeerderingsteelt) 280 mg/L. De in de studie van Stapel et al (2000) gebruikte spuitvloeistofconcentratie ligt dus in de range van de in Nederland toegelaten spuitvloeistofconcentraties

aan imidacloprid. Hoe zich dat verhoudt tot de dosering per plant en/of per hectare, en tot de hoeveelheid imidacloprid in nectar en pollen voor de in Nederland toegelaten gewassen is lastig te bepalen. Ter indicatie is vergeleken met de dosering per plant van Admire in vruchtgroenten (druppelbehandeling, bedekte teelt) die neerkomt op 2.45-9.8 mg imidacloprid per plant. Dit is beduidend hoger dan de in de studie van Stapel et al (2000) gebruikte dosering per katoenplant 0.95 mg/plant. Het is niet mogelijk om in het tijdskader van deze analyse de doseringen door te vertalen naar kg a.s./ha.
Belangrijk om te bedenken is dat het in de studie uiteindelijk gaat om de concentraties in de nectar waaraan de wespen werden blootgesteld, maar deze concentraties zijn niet gemeten in het onderzoek.

Zoals besproken door de auteurs van dit artikel zijn dit soort subletale effecten van belang om te bepalen of middelen negatieve effecten hebben op natuurlijke vijanden die van groot nut zijn in de landbouw. De auteurs stellen dat deze effecten niet onderzocht worden wanneer voorspellingen worden gedaan over de compatibiliteit van middelen met biologische bestrijding en IPM. Niet helemaal duidelijk is of ze hiermee op de toelatingspraktijk voor stoffen en middelen doelen, maar de auteurs maken hierin echter een terecht punt, omdat in de toelatingsbeoordeling in de eerste twee trappen alleen onderzoek naar negatieve effecten op overleving en reproductie worden gebruikt. De meer subtiele subletale effecten zoals onderzocht in Stapel et al (2000) kunnen pas aan de orde komen in hogere tier veldtesten, maar ook dan worden ze vaak niet expliciet onderzocht. Als ze bij lagere concentraties optreden dan de mortaliteitswaarde (LR50) die in de eerste Tier wordt gehanteerd als norm, en er zijn geen hogere tier veldtesten uitgevoerd, dan worden deze effecten dus gemist in de risicobeoordeling.

Vallen deze effecten binnen het toetsingskader?
Gebaseerd op de Uniform Principles (Annex VI bij 91/414/EEC, ook geldend onder 1107) en de data requirements (Commission Regulation 283/2013) kan geconcludeerd worden dat dit soort effecten binnen ons toetsingskader vallen. De UB spreekt van 'letale of subletale effecten' zonder de subletale effecten nader te specificeren, dus ook de subletale effecten als vliegrespons en levensduur kunnen daaronder vallen.

De data requirements vragen in Tier 1 alleen om mortaliteitstesten met sluipwesp en roofmijt, maar maken daarbij de volgende opmerking
'With active substances suspected of having a special mode of action (such as insect growth regulators, insect feeding inhibitors) additional tests involving sensitive life stages, special routes of uptake or other modifications, may be required by the national competent authorities. The rationale for the choice of test species used shall be provided.'
Deze opmerking laat ruimte voor ander(soortige) testen, hoewel dan eerst bepaald zou moeten worden of het werkingsmechanisme van neonicotinoiden als 'specifiek' bestempeld kan worden.
De Guidance in ESCORT 2 legt het beschermdoel in de hoogste tier (veldtesten) op het niveau van de populatie van een soort, dus geen individuele effecten. Het gaat daarbij uiteindelijk om abundantie (aantallen). Als er geen effect op abundantie wordt gevonden, betekent dit dat binnen de studie de eventueel opgetreden subletale effecten niet hebben doorgwerkt op de overleving. Hierbij moeten ook de benodigde tijd voor herstel en/of herkolonisatie in beschouwing worden genomen. Er zijn geen vaste drempelwaarden voor acceptabele effectniveaus, dit kan verschillen per soort, de beoordeling wordt gebaseerd op expert judgement, case-by-case.

Samenvattende conclusies Stapel et al (2000):
- Op grond van de studie van Stapel et al (2000) is het niet mogelijk een harde conclusie te trekken over het te verwachten effect op populatieniveau. Het artikel liet echter zien dat de effecten op individuele vliegrespons reversibel waren. Voor de levensduur kunnen geen conclusies worden getrokken over de reversibiliteit van het effect, wel was er een trend te zien dat de significantie van het effect afnam in de loop van de tijd.
- De blootstellingsroute van sluipwespen via nectar en pollen is relevant voor in Nederland toegelaten middelen met imidacloprid. Deze blootstelling is in theorie mogelijk bij gewas- en zaadbehandelingen.
- Een goede extrapolatie naar de te verwachten blootstelling als gevolg van de in Nederland toegelaten middelen met imidacloprid is niet te maken, maar de studie lijkt geen overdreven hoge blootstelling te hebben gebruikt, zoals wel in sommige andere artikelen het geval is.
- Echter bij alle Nederlandse toelatingen op basis van imidacloprid zijn restricties op het WG opgenomen om de bijen te beschermen, o.a. door middel van het verbieden dat het middel verspoten wordt op of in de buurt van bloeiend gewas en onkruiden, het perceel vrijhouden van bloeiende onkruiden gedurende een bepaalde periode na toepassing, wachttijden voordat weer nieuwe, bij-aantrekkelijke gewassen mogen worden gezaaid of geplant, en het voorschrijven van insectengaas bij kassen. Deze restricties,

mits nageleefd, voorkomen ook in zekere mate blootstelling van andere insecten dan bijen via nectar en pollen (in zekere mate omdat: bij-aantrekkelijk niet extrapoleerbaar is naar andere arthropoden, en omdat de maatregelen alleen in-field gelden). De zaadbehandelingen zijn alle op niet bloeiende gewassen.
-Alleen voor de toelating in aardappelen als grondbehandeling tijdens het poten (Potatoprid) is blootstelling via pollen van andere arthropoden niet uit te sluiten. Aangezien er geen concentraties in nectar zijn gemeten in de studie van Stapel et al (2000), er geen concentraties in pollen van aardappelen bekend zijn voor Nederland, en de situatie van een bespuiting in katoen niet extrapoleerbaar is naar een grondbehandeling in aardappels, is het niet mogelijk om een vergelijking te maken tussen de mate van blootstelling in de studie en de te verwachten blootstelling bij de toepassing van Potatoprid. Het valt echter te verwachten dat bespuiting van bloeiende katoenplanten tot een beduidend hogere dosering aan imidacloprid in nectar zal leiden dan een grondbehandeling tijdens het poten van aardappelen.
- Al het bovenstaande in beschouwing genomen geeft het artikel niet voldoende aanleiding om de in Nederland toegelaten middelen op basis van imidacloprid te herbeoordelen.
Voor toekomstige beoordelingen verdient het wel aanbeveling om blootstelling van sluipwespen (en andere arthropoden) via nectar en pollen mee te nemen in de risicobeoordeling. De huidige risicobeoordeling voor arthropoden gaat enkel uit van contactblootstelling via residuen en directe overspray. In de recent verschenen EFSA-opinie[19] die ten grondslag zal liggen aan de gereviseerde guidance voor niet-doelwitarthropoden wordt het belang van andere blootstellingsroutes zoals inname van gecontamineerd voedsel aan de orde gesteld. De verwachting is dat de toekomstige guidance op dit gebied verbetering zal brengen. De herziene guidance wordt op dit moment in 2018 verwacht.

Overige artikelen die worden besproken in het EASAC-rapport, Annex A4.4 Effects on natural predators, i.e. niet uit het review van Pisa et al (2015):
Mullin et al (2010): Er wordt in het EASAC-rapport verwezen naar een studie van Mullin et al (2010), waarin 18 soorten loopkevers werden blootgesteld aan met neonicotinoiden behandeld zaad, waarbij voor alle soorten bijna 100% mortaliteit optrad binnen 4 dagen. Dit ljkt echter een foutieve verwijzing; de studie van Mullin et al (2010) is een studie naar residuen van mijticiden en agrochemicals in honingbijen in Noord-Amerika. Het is niet duidelijk om welke studie met loopkevers het wel zou kunnen gaan.

Rogers and Potter (2003): In dit artikel werd het effect van imidacloprid na toepassing in golfvelden in de VS op het parasiteringssucces van de sluipwesp *Tiphia vernalis* onderzocht. Deze sluipwesp is een natuurlijke vijand van de larve van de loopkever *Popilia japonica*, deze kerverlarve is een belangrijke wortelplaag in graslanden. De sluipwesp komt uit Azie en is geimporteerd naar de VS als natuurlijke plaagbestrijder. Imidacloprid (Merit 75 WP) werd verspoten in een dosering van 0.45 – 0.225 kg a.s./ha (handspray van enclosures in het grasveld), daarna werden de testplots beregend met water (1.5 cm). Na monstername (op dag 21) werd het aantal geparasiteerde keverlarven geteld. Het experiment werd ook in het lab uitgevoerd met soil cores bij dezelfde doseringen, waarna effect op parasiteringsgraad, mortaliteit, levensduur en eilegsucces van de sluipwesp werd bepaald. Ook werd gekeken of de sluipwespen imidacloprid blootstelling vermeden, en werd het effect van de imidacloprid blootstelling op de ontwikkeling van de sluipwesplarven onderzocht.

De gevonden effecten waren:
- significant afgenomen parasitering van keverlarven door sluipwespen op de imidacloprid behandelde plots bij beide doseringen, zowel in het lab- als veldexperiment (afname in aantallen geparasiteerde keverlarven ten opzichte van de controle na imidaclopridbehandeling met 0.225 en 0.45 kg a.s.ha was resp. 19% en 70%)
- geen significant effect op mortaliteit en levensduur van adulte wespen en ontwikkelingsperiode van sluipwesplarven
- de wespen vertoonden geen vermijding van imidaclopridresiduen

Het bovengenoemde effect valt binnen het toetsingskader (er wordt gekeken naar parasitering door sluipwespen; de Tier 1 testsoort is wel een andere), en zou gemist kunnen worden in de risicobeoordeling als er alleen Tier 1 testen beschikbaar zijn, want daarin wordt alleen mortaliteit getest, en als er geen higher tier testen in het dossier zitten waarin deze subletale effecten op de parasitatie alsnog zijn meegenomen.

De Nederlandse toelating van imidacloprid in golfvelden (Merit turf) heeft een voorgeschreven maximale dosering van 1x 0.15 kg a.s/ha. Op grond van het bovenstaande zijn de te verwachten effecten op

[19] EFSA PPR Panel, 2015. Scientific Opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for non-target arthropods. EFSA Journal 2015;13(2):3996, 212 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.3996

parasitering bij deze toegelaten dosering kleiner dan 50% (want het effect in de studie bij 0.225 kg a.s./ha was 19%) en voldoen daarmee aan de norm.

Voor de andere in Nederland toegelaten middelen op basis van imidacloprid geldt hetzelfde, kijkend naar de maximaal toegelaten doseringen:
- Sombrero zaadbehandeling: 0.090 en 0.120 kg a.s./ha
- Potatoprid grondbehandeling: 0.180 kg a.s./ha
- Admire en Kohinor: diverse toepassingen, alle veldtoepassingen blijven onder de 1x 0.225 kg a.s./ha. Sommige glasteelten komen hier net boven, maar op het etiket is daarom een waarschuwingszin voor het gebruik van natuurlijke vijanden opgenomen.
- Gaucho tuinbouw: alleen toelatingen van groenten na bedekte opkweek, dosering in kg /ha niet op WG, maar gezien de bedekte opkweek is te verwachten dat de blootstelling van de bodem bij deze toelating niet hoger zal zijn dan de bovengenoemde toelatingen.

Op grond van het bovenstaande geeft het artikel geen verdere aanleiding tot herbeoordeling van de in Nederland toegelaten middelen op basis van imidacloprid. Wel is het aanleiding om voor toekomstige beoordelingen blootstelling van sluipwespen via de bodem expliciet mee te nemen (tot nu toe werd voor sluipwespen alleen blootstelling via residuen op blad meegenomen, dus bij bodembehandeling en zaadbehandeling werd het risico voor sluipwespen niet beoordeeld). Dit past binnen het toetsingskader en heeft geen nieuwe datavereisten tot gevolg.

Poletti et al. (2007): In deze studie werd het effect van acetamiprid, imidacloprid en thiamethoxam op de twee roofmijten *Neoseiulus californicus* en *Phytoseiulus macropilis* (Acari: Phytoseiidae) en hun 'funcionele respons' op *Tetranychus urticae* eieren (spintmijt) onderzocht. Onder functionele respons lijkt in het artikel te worden verstaan: het door de roofmijten geconsumeerde aantal eieren van de spintmijt. De neonicotinoiden werden in het laboratorium verspoten op bladgedeeltes (leaf discs) van bonenplanten waarop eieren van de spintmijt waren geplaatst, met spuitconcentraties van resp. 80, 280 en 135 mg a.s./L voor acetamiprid, imidacloprid en thiamethoxam. Dit komt waarschijnlijk[20] neer op testdoseringen voor acetamiprid, imidacloprid en thiamethoxam van resp. 12.8, 44.8 en 21.6 kg a.s./ha.

De gevonden effecten waren:
- Beide soorten: geen significante toename van mortaliteit ten opzichte van de controle (alledrie de neonicotinoiden)
- *N. californicus*: voor imidacloprid een verlaagde 'attack coefficient' (niet sign.) en significant effect op 'prey handling time' (verhoging), en een verlaging van ei-consumptie met 55% ten opzichte van de piek-consumptie; geen effect van de andere neonicotioiden.
- *P. macropilis*: verlaagde 'attack coefficient' (niet sign.) voor alledrie de neonicotioiden en significant effect op 'prey handling time' (verhoging) voor acetamiprid en imidacloprid; een significante verlaging van ei-consumptie ten opzichte van de piek-consumptie voor alledrie de neonicotinoiden (voor imidacloprid: 87%).

Het artikel concludeert dat aandacht moet worden besteed aan het gebruik van neonicotinoiden in samenhang met IPM-programma's.
De onderzochte effecten in het artikel zijn subletaal, maar kunnen wel van invloed zijn op de populatie en vallen in die zin binnen het toetsingskader. Dit soort effecten worden echter niet standaard onderzocht in Tier 1 labtesten met roofmijten. Mogelijk worden ze wel meegenomen in hogere tier veldtesten.

De in het artikel gebruikte doseringen zijn echter vele malen hoger dan de in Nederland toegelaten doseringen van deze drie stoffen. Het gaat hierbij om gewasbespuitingen, aangezien het onderzoek bladbewonende roofmijten betrof. Voor imidacloprid zijn de maximaal toegestane doseringen als gewasbespuiting alle < 0.225 kg a.s./ha, dus minimaal een factor 199 lager dan getest in de studie. Voor acetamiprid en thiamethoxam zijn de maximaal toegestane doseringen als gewasbespuiting 0.45 kg

[20] Uit het artikel wordt niet goed duidelijk wat de dosering per oppervlakte-eenheid was: een dosering van 2mL testoplossing per spray resulterend in 1.60 mg/cm^2 wordt vermeld als testdosering maar waar de 'mg' naar verwijst wordt niet vermeld, en ook niet hoeveel 'sprays' gebruikt werden per leaf disc. Er vanuitgaand dat de 1.60 mg verwijst naar mg spuitvloeistof, en dat dit ongeveer overeenkomt met 1.6 mL spuitvloeistof (geen gegevens over de dichtheid bekend, daarom waterdichtheid aangenomen), komt dit neer op testdoseringen voor acetamiprid, imidacloprid en thiamethoxam van resp. 12.8, 44.8 en 21.6 kg a.s./ha.

a.s./ha (3x0.15 kg a.s./ha) en 0.075 kg a.s./ha (3x0.025 kg a.s./ha) resp., dus resp. een factor 28 en 288 lager dan getest in de studie. Samen met het feit dat er binnen de risicobeoordeling ook nog een herstelperiode in beschouwing wordt genomen, die in dit artikel niet nader is onderzocht, geeft het artikel niet voldoende aanleiding om de in Nederland toegelaten middelen op basis van acetamiprid, imidacloprid en thiamethoxam te herbeoordelen.

Kramarz en Stark (2003): In het EASAC-rapport wordt beschreven dat in deze studie werd aangetoond dat imidacloprid alleen geen effect had op de sluipwesp *Aphidius ervi*, maar dat er grote negatieve effecten waren in combinatieblootstelling met cadmium uit kunstmest (laboratoriumstudie met potplanten, blootstellingsconcentraties en hoogte van effecten verder niet genoemd).
Het bovengenoemde combinatie-effect is zeer wel mogelijk van belang in de praktijk, het is echter geen onderdeel van de huidige toelatingsbeoordelingsystematiek voor individuele middelen.

- *Artikelen uit hoofdstuk Agricultural ecosystem effects (iatrogenic pests)*

Douglas (2014):
In deze studie in de VS werd het effect van zaadbehandeling met thiamethoxam (in combinatie met fungicide) in soja onderzocht op interacties tussen sojabonen, slakken en hun insect-predatoren (*Chlaenius tricolor* kevers in dit geval), zowel in het laboratorium als in het veld.
In het lab werden de volgende effecten gevonden:
- geen negatief effect op de pest slak Deroceras reticulatum
- 84-89% van de kevers waren '*impaired*','i.e. 'gehandicapt', gemeten als de tijd die de kever nodig had om zich weer op zijn pootjes te draaien nadat hij door de onderzoekers op zijn/haar rug was gedraaid, daarnaast werden ook andere motorische symptomen waargenomen (e.g. stuiptrekkingen, gehele of gedeeltelijke verlamming).
- 38% van de '*impaired*' kevers ging dood, de overige kevers herstelden na gemiddeld 4.3 dagen.

In het veld werden de volgende effecten gevonden:
- afname van actieve dichtheid van predatore kevers van 31% (gemeten via grondvallen (pitfalls)); na 1 maand geen significant verschil meer
- afname predatie op 'kunstprooi' (rupsen die de onderzoekers in het veld hadden geplaats op vaste plekken) met 33%
- toename van slakkendichtheid van 67%; de toename duurde de gehele studieperiode
- afname van sojagewasdichtheid van 19% en opbrengst met 5%

Analyse van residuen:
- afname van 96% per trofisch niveau van de neonicotinoiden (in de slakken zat 96% minder dan in de sojabonen, en in de kevers 96% minder dan in de slakken)
- concentratie in slakken in het veldexperiment: 500 ppb aan neonicotinoiden (13 ng/slak), afnemend tot 177 ppb (6 ng/slak) in het 1-bladstadium van het sojagewas, tot niet detecteerbaar aan het eind van het seizoen (residuen bestonden voornamelijk uit thiamethoxam, maar ook clothianidin en andere metabolieten)
- regenwormen bevatten neonicotinoidengehaltes van 54-279 ppb (16-126 ng/worm), waarvan 25-23 ppb imidacloprid.

Voor een eerste risico-inschatting moet worden gekeken naar de gebruikte thiamethoxam doseringen in de studie. In het laboratoriumexperiment was dit 0.0756 mg a.s./zaad en 0.152 mg a.s./zaad. In het veldexperiment werd alleen de hoge dosering van 0.152 mg a.s./zaad gebruikt, bij een zaaidichtheid van de soja van 444600 zaden/ha, resulterend in 67.6 g a.s./ha.

In Nederland toegelaten zaadbehandelingen met thiamethoxam zijn:
-Cruiser SB zaadbehandeling in bieten met max 60 g a.s./ha, en 15800 mg a.s./kg zaad.
De dosering per zaadje is dus vele malen hoger dan in de studie gebruikt, de velddosering in g a.s./ha is echter wel gelijk. De enige verklaring voor dit verschil is het gewas; de studie is uitgevoerd met soja, blijkbaar is daarvoor de dosering per zaad vele malen lager dan voor suikerbieten (gepilleerd).
-Cruiser 70 WS zaadbehandeling in:
  - sla, andijvie – bedekte opkweek met 107 g a.s/ha en 5.47 mg a.s./kg zaad+ zaailing gemeten in de slaplantjes na uitplanten
  - koolachtigen – bedekte opkweek met 88 g a.s/ha en 28.03 mg a.s./kg zaad+ zaailing gemeten in de slaplantjes na uitplanten

Uit het bovenstaande kan geconcludeerd worden dat de studie van Douglas et al (2014) bij relevante doseringen is uitgevoerd: zowel wat betreft dosering werkzame stof per zaadje als dosering werkzame stof per ha zijn in Nederland hogere doseringen toegelaten.

De bovenstaande blootstellingsroute via predatie op slakken wordt momenteel niet expliciet in beschouwing genomen in de risicobeoordeling voor niet-doelwitarthropden. Echter: in het toetsingskader voor stoffen en middelen is opgenomen dat een herstelperiode in beschouwing kan worden genomen voor de bepaling van het risico en de conclusie over het al dan niet voldoen aan de norm. Voor niet-doelwitarthropoden is dit in het veld een periode van 1 jaar. (Blootstelling buiten het veld wordt voor niet-doelwit arthropoden niet in beschouwing genomen bij zaadbehandelingen) Gezien de herstelperiode van 4 dagen die in de bovenstaande studie werd gevonden, is het te verwachten dat ook bij de hogere doseringen zoals in Nederland toegelaten, herstel binnen een jaar zal optreden. Daarnaast zijn in de Cruiser-dossiers met 5 uitgebreide veldstudies met behandelde zaden de effecten op de bodemarthropodenfauna onderzocht. Hierin werden effecten met herstel binnen een jaar aangetoond, en het is goed mogelijk dat voedselwebinteracties zoals doorvergifiting via slakken in deze studie meegenomen zijn. Hoewel niet expliciet gemeten en beschreven, bevat een full-community veldstudie in principe ook voedselwebinteracties, die indirect gemeten worden via de effecten op abundantie van de individuele soorten. Op grond van de gezamenlijke beschouwing van deze 5 studies heeft Ctgb geconcludeerd dat wordt voldaan aan de norm.

Een kanttekening die hierbij geplaatst moet worden is dat herstel in het perceel een gevolg kan zijn van herkolonisatie door niet-doelwitarthropoden van buiten het perceel. Zo kan er geconcludeerd worden dat er in het perceel voldoende snel herstel optreedt, terwijl buiten het perceel (off-field) de populatie 'leeggetrokken' wordt ('sink-source-effect'). Op dit moment groeit het inzicht dat dit effect optreedt en dat de huidige risicobeoordelingssystematiek voor niet-doelwitarthropoden op het punt van herstel niet beschermend genoeg is. Dit wordt beschreven in de recent verschenen EFSA-opinie[21] die ten grondslag zal liggen aan de gereviseerde guidance voor niet-doelwitarthropoden.
Ook kan op grond van het bovenstaande artikel geconcludeerd worden dat de route van doorvergiftiging onderbelicht is in de huidige beoordelingsmethodiek voor niet-doelwitarthropoden. In de revisie van de relevante guidance die momenteel gaande is (zie boven), wordt echter aandacht besteed aan een meer uitgebreide risicobeoordelingsmethodiek voor alle relevante blootstellingsroutes van arthropoden.
Het effect van toegenomen plaagdruk en afgenomen gewasopbrengst door negatieve effecten op natuurlijke predatoren als gevolg van het gebruik van insecticiden tenslotte is een algemeen bekend verschijnsel. Deze negatieve interacties in de intensieve landbouwpraktijk zijn echter geen onderdeel van de huidige toelatingsbeoordelingssystematiek voor individuele middelen. Het Ctgb beoordeelt wel de risico's voor natuurlijke vijanden, maar het huidige toetsingskader is waarschijnlijk niet afdoende om bovengenoemde negatieve interacties geheel te voorkomen, o.a. doordat lange herstelperiodes meegenomen worden in de risicobeoordeling, niet alle blootstellingsroutes in beschouwing worden genomen en subtiele, subletale effecten gemist kunnen worden in de eerste Tier testen. Het Ctgb is echter niet bevoegd om nieuwe beoordelingscriteria (bijvoorbeeld toegenomen plaagdruk) op te nemen in de (milieu-) risicobeoordeling.

Van belang om te noemen is nog wel dat in de stof data requirements onder 1107 (Regulation 283/2013) het volgende staat opgenomen bij hoofdstuk 8, Ecotoxicologische studies:

> 4. The potential impact of the active substance on biodiversity and the ecosystem, including potential indirect effects via alteration of the food web, shall be considered.

Het kan beargumenteerd worden dat de bovengenoemde negatieve interacties onder deze passage van de data requirements vallen. Het is echter nergens uitgewerkt en vastgelegd hoe dit dan beschouwd zal moeten worden in de risicobeoordeling van een middel of stof. Wat voor studies moeten er worden geleverd, wat voor eindpunten moeten er worden gebruikt en tegen welke normen moeten ze worden getoetst? Het Ctgb heeft geen handvatten om uitvoering te geven aan dit data requirement.
Op grond van de huidige guidance kan dus worden geconcludeerd dat er wordt voldaan aan de norm en dat het artikel geen verdere aanleiding geeft tot herbeoordeling, maar wel met het inzicht dat de huidige

[21] EFSA PPR Panel, 2015. Scientific Opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for non-target arthropods. EFSA Journal 2015;13(2):3996, 212 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.3996

guidance mogelijk niet beschermend genoeg is voor niet-doelwitarthropoden. De verwachting is dat dit binnen enkele jaren verbeterd zal worden (herziene guidance wordt verwacht in 2018).

De volgende drie artikelen gaan net als bovenstaand artikel over het verschijnsel van toegenomen plaagdruk als gevolg van behandeling met neonicotinoïden, door (o.a.) negatieve effecten op natuurlijke vijanden. Voor de conclusie op basis van deze drie artikelen kan worden aangesloten bij de conclusie hierboven voor het artikel van Douglas et al. (2014):

Ekböm en Müller (2011): Van dit artikel wordt in het EASAC-rapport besproken dat de auteurs een mogelijke resistentie van bladhaantjes (Chrysomelidae) tegen neonicotinoide zaadbehandelingen hebben gevonden, en dat dit in combinatie met negatieve effecten op de natuurlijke vijanden van de bladhaantjes kan leiden tot toegenomen plaagdruk in koolachtigen. In de studie zijn geen directe negatieve effecten van neonicotinoiden op (predatore) niet-doelwitarthropoden onderzocht.

Smith et al. (2013): In deze studie werden in de VS de effecten onderzocht van verschillende (combinaties van) zaadbehandeling met neonicotinoiden en insecticiden op plaagdruk in katoen door de bonenspintmijt (*Tetranychus urticae*). De studie wees uit dat het gebruik van zaadbehandeling met neonicotinoiden leidt tot hogere aanwezigheid van spintmijten en dat negatieve effecten op de natuurlijke vijanden van de mijten een mogelijke oorzaak zijn, naast een toegenomen reproductie van de mijten (waargenomen na blootstelling in het veld aan thiamethoxam op blad). In de studie zijn geen directe negatieve effecten van neonicotinoiden op (predatore) niet-doelwitarthropoden onderzocht.

Szczepaniec et al. (2011): In Central Park, New York, brak na behandeling van iepen met imidacloprid een plaag uit van tot voorheen onschadelijke spintmijten (de imidacloprid behandeling was tegen twee houtkeversoorten gericht; spintmijten zijn ongevoelig voor imidacloprid). De auteurs concluderen op basis van 3 jaar veld- en labexperimenten dat dit het gevolg was van doorvergiftiging van natuurlijke predatoren van de spintmijt via aan imidacloprid blootgestelde prooi-arthropoden, en van een toegenomen reproductie van de mijten als gevolg van blootstelling aan imidacloprid (beide effecten vastgesteld met labexperimenten). In de labexperimenten met lieveheersbeestjes en gaasvliegen (predatoren van de spintmijt) werd vastgesteld dat vergifitiging via prooi een scala aan negatieve subletale effecten gaf (e.g. verstoorde mobiliteit, regurgitatie, stuiptrekkingen en bij rugligging niet meer terug kunnen draaien), in tegenstelling tot blootstelling via bladresiduen.
De doseringen in het artikel zijn uitgedrukt in g per boomstamdiameter en niet goed te herleiden tot g/ha. Gezien de geringe relevantie van de toepassing op iepen in een stadspark voor de landbouwsituatie, is dit niet verder geanalyseerd.

Constateringen niet doelwitarthropoden (andere dan bijen en hommels):

- Risicobeoordeling voor Lepidoptera, met name via rupsen in de bodem verdient meer aandacht in de risicobeoordeling. Dit zal naar verwachting geadresseerd worden in de nieuwe guidance voor niet-doelwitarthropoden van EFSA.
- Blootstellingsroute via nectar en pollen van sluipwespen en andere predatore arthropoden verdient meer aandacht in de risicobeoordeling. Dit zal naar verwachting geadresseerd worden in de nieuwe guidance voor niet-doelwitarthropoden van EFSA.
- Doorvergiftiging van predatore arthropoden, bijv. via (ongevoelige) slakken verdient meer aandacht in de risicobeoordeling. Dit zal naar verwachting geadresseerd worden in de nieuwe guidance voor niet-doelwitarthropoden van EFSA.
- Blootstelling van sluipwespen via de bodem dient te worden meegenomen in de risicobeoordeling (kan per direct).
- Op dit moment groeit het inzicht dat de huidige risicobeoordelingssystematiek voor niet-doelwitarthropoden op het punt van herstel niet beschermend genoeg is (door optreden van het zgn. sink-source effect, waarbij in de omgeving buiten de percelen ook steeds meer arthropoden verdwijnen als gevolg van negatieve effecten binnen het perceel). Dit wordt beschreven in de recent verschenen EFSA-opinie[22] die ten grondslag zal liggen aan de gereviseerde guidance voor niet-doelwitarthropoden.

[22] EFSA PPR Panel, 2015. Scientific Opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for non-target arthropods. EFSA Journal 2015;13(2):3996, 212 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.3996

Bodemorganismen

- *Artikelen uit hoofdstuk Effects on soil organisms*

Wang et al. (2012): In deze study zijn acute LC50-waarden bepaald voor regenwormen (*Eisenia fetida*) voor 24 verschillende insecticides, waaronder de neonicotinoiden acetamiprid, clothianidin, imidacloprid, nitenpyram (niet toegelaten in Nederland, daarom verder buiten beschouwing gelaten in hiernavolgende tekst) en thiacloprid. Toxiciteit werd bepaald door middel van twee testen: een test met filterpapier en een test met kunstgrond. De laatste test is ook standaardonderdeel van middel- en stoffendossier en daarom het meest relevant. De toxiciteit van alle niet-neonicotinoiden-insecticiden lag beduidend lager dan de toxiciteit van de neonicotinoiden, vanaf 1 tot meerdere ordes van grootte.

In onderstaande tabel zijn de LC50-waardes die werden gevonden voor de neonicotinoiden in de studie van Wang et al. weergegeven (test met kunstgrond), met in de laatste kolom de eindpunten door Ctgb gebruikt voor de risicobeoordeling (i.e. het in de EU-stofbeoordeling vastgestelde eindpunt); zowel acuut als chronisch.

	14d LC50 (mg a.s./kg soil dw)	**14d LC50 (mg a.s./kg soil dw)**	**56d NOEC (reproduction) (mg a.s./kg soil dw)**	**NOEC-level uit veldstudies (g a.s./ha)***
	(Wang et al (2012)	**EU List of endpoints**	**EU List of endpoints**	**EU List of endpoints**
acetamiprid	1.52	9 (getest met a.s.) 3.66 (getest met middel Gazelle; eindpunt in a.s.)	0.252 (getest met middel Gazelle; eindpunt in a.s.)	-
clothianidin	6.06	13.21	-	225 g a.s./ha
imidacloprid	2.82	10.7	0.178	150 g a.s./ha
thiacloprid	10.96	105	<62.5 g a.s./ha	250 a.s./ha

* geen bodemgehaltes gemeten

Voor acetamiprid is in de studie van Wang et al. een lagere LC50 gevonden dan het officiele EU stof-eindpunt. In Nederland is Gazelle het enige toegelaten middel op basis van acetamiprid (gewasbespuiting in diverse teelten), en de LC50 op basis van de test met het middel Gazelle is gebruikt in de risicobeooordeling. Hierbij werd de norm (veiligheidsfactor 10) gehaald met een veiligheidsmarge van een factor 7. (Dit betekent dat de LC50 van 3.66 mg a.s./kg grond een factor 70 hoger ligt dan de berekende blootstelling in de bodem.) De veiligheidsmarge uit de risicobeoordeling van een factor 7 is ruim voldoende om het verschil tussen de LC50 voor Gazelle en de LC50 van Wang et al. af te dekken.

Daarnaast is het van belang dat het eindpunt uit de reproductiestudie met acetamiprid bepalend is voor de risicobeoordeling, aangezien het vele malen lager ligt dan de acute LC50. Over het algemeen kan gesteld worden dat het eindpunt van de reproductiestudie voor bijna alle stoffen kritischer zal zijn dan de acute LC50. In de nieuwe data requirements onder 1107 (Regulations 283/2013 en 284/2013) is de acute toxiciteitstest met regenwormen niet langer vereist, de reproductietest daarentegen is een vast datavereiste geworden (hierin wordt ook mortaliteit gemeten).

Ook voor clothianidin is in de studie van Wang et al. een lagere LC50 gevonden dan het officiele EU stof-eindpunt. In Nederland is Poncho Beta het enige toegelaten middel op basis van clothianidin (zaadbehandeling suikerbieten; max. 0.060 kg a.s./ha). In de risicobeoordeling werd de norm (veiligheidsfactor 10) gehaald met een veiligheidsmarge van een factor 2. Deze veiligheidsmarge van een factor 2 is ongeveer gelijk aan het verschil tussen de LC50 van Wang et al. Daarnaast werd met een veldtest met dosering een factor 3 hoger dan de maximaal toegestane dosering een acceptabel risico aangetoond. Er is dus geen aanwijsbaar risico op basis van de LC50 van Wang et al.

Voor imidacloprid en thiacloprid geldt eenzelfde verhaal: er is in de studie van Wang et al. een duidelijk lagere LC50 gevonden dan het officiële stofeindpunt. Maar ook hier geldt weer dat het reproductie-eindpunt meer kritisch is voor de risicobeoordeling dan het acute eindpunt. Het reproductie-eindpunt voor beide stoffen ligt lager dan de LC50 van Wang et al., waardoor, te zien aan de eindpunten, een

veldstudie vereist werd, die een acceptabel risico liet zien. Er zijn dus geen aanwijsbare risico's op basis van de studie van Wang et al.

De vraag rest waardoor het verschil in LC50-waarden van Wang et al. en de EU-eindpunten wordt veroorzaakt. Aangezien er echter met bovenstaande analyse is aangetoond dat er geen aanwijsbare risico's zijn op basis van de studie van Wang et al., en aangezien het acute eindpunt voor regenwormen niet langer vereist is onder 1107 (maar wordt afgedekt door de meer kritische reproductiestudie), is een nadere analyse van het artikel niet noodzakelijk.

Peck (2009a,b): De studie van Peck (2009**b**) is hierboven al besproken (zie paragraaf 'Andere artikelen uit het review van Pisa et al. (20015)'). De studie van Peck (2009**a**) betreft een uitbreiding van bovenstaande studie, met 3 jaar behandeling erbij (dus in totaal 6 jaar) en met bemonstering met pitfalls erbij (naast bemonstering met bodemcylinders). De dosering in de studie bedroeg net als in Peck 2009b 1x/jaar 0.37 kg a.s./ha. De resultaten kwamen overeen met de resultaten van de eerdere studie (Peck 2009b), met als verschil dat nu ook statistisch een significante effect op Hemiptera abundantie werd gevonden: gemiddeld 63.7% verlaagd over de 5 jaren (stat. sign.). Opvallende bevinding was daarnaast dat de pitfall-gegevens geen statistisch significant effect van de behandeling liet zien, wat aanduidt dat niet de arthropodenfauna actief op het bodemoppervlak, maar alleen de fauna in de grond een negatief effect ondervond.

Zoals geconcludeerd bij de studie van Peck (2009b), geeft de studie niet voldoende aanleiding om de bestaande toelating van Merit Turf te herbeoordelen.
Voor eventuele toekomstige toelatingen van imidacloprid in grasvelden bij hogere doseringen is de studie wel relevant. Als deze situatie zich voordoet, zal de studie door het Ctgb worden geevalueerd en meegenomen in de risicobeoordeling.

Kreutzweiser 2008 en 2009: In de eerste studie (uit 2008), uitgevoerd in de V.S., werd het effect onderzocht van imidacloprid concentraties in bladeren van esdoorns (vlak voor de bladval) die behandeld waren met imidacloprid (tegen houtkevers). De spuitdosering is niet gegeven in het artikel, de gemeten concentraties in de bladeren bedroegen gemiddeld 3.2 en 11.0 mg a.s./kg versgewicht. De bladeren werden geplaatst in terrestrische en aquatische microcosms gedurende 14-35 dagen. Bij deze concentraties trad er geen mortaliteit op bij aquatische insecten of regenwormen, maar waren er wel statistisch significante subletale effecten: afgenomen voedselinname, afgenomen decompositie (gemeten als blad-gewichtsverlies), gewichtsverlies bij regenwormen. Er zijn geen effectpercentages gerapporteerd. De auteurs concluderen dat imidaclopridbehandeling van esdoorns resulteert in imidaclopridresiduen in blad die het natuurlijke decompositieproces afremmen.

In de studie van 2009 werd voor het bovengenoemde verschijnsel verder onderzocht, in een vergelijkbare studie-opzet, of de organismen in de microcosms de imidaclopridresiduen konden detecteren en vermijden (in de discussie-sectie van de studie uit 2008 vroegen de auteurs zich af of de verminderde decompositie een gevolg was van het vermijden van de bladeren, of van subletale toxiciteitseffecten). De imidaclopridgehaltes in de esdoornbladeren in deze studie waren gemideld 18-30 mg/kg. Er werd geen significante voorkeur gevonden voor de onbehandelde bladeren, op grond waarvan de auteurs concluderen dat regenwormen de imidaclopridresiduen niet konden detecteren en vermijden[23]. Op basis van de resultaten concluderen de auteurs dat de afgenomen voedselinname (decompositie) door regenwormen van bladeren met imidaclopridresiduen wordt veroorzaakt door subletale effecten als gevolg van blootstelling aan imidacloprid.

Hoewel het in de bovenstaande studie geen landbouwsituatie betreft, kan een korte berekening worden uitgevoerd om een beeld van de relevantie van de concentraties in de studie te krijgen. Bij de risicobeoordeling voor vogels en zoogdieren is de hoogste gemiddelde RUD-waarde (residue per unit dose) voor bespoten planten een waarde van 54.2. Vermenigvuldigd met de maximaal toegestane dosering als volvelds gewasbespuiting in Nederland voor imidacloprid (0.15 kg a.s./ha), geeft dit een verwacht residuegehalte in bespoten planten van 8.13 mg a.s./kg versgewicht. De concentraties in de studie zijn dus, quantitatief, realistisch. De relevantie van decompositie van esdoornbladeren voor het een landbouwperceel is echter laag; extrapolatie van de studiegegevens naar een gewas(situatie) is onzeker, ook zijn esdoorns geen kenmerkende bomen voor landbouwgebied.

[23] Dit in tegenstelling tot wat er in de tekst van het EASAC-rapport vermeld staat bij dit artikel, namelijk dat de decompositie afnam doordat de wormen de bladeren vermeden.

Het dossier van imidacloprid bevat testen met 2 bodem-oppervlakte bewonende arthropoden, waarvan voor 1 soort (*P. cupreus*) zowel adulten als larven zijn getest, testen met Collembola en bodemmijten, regenwormenveldtesten, testen met bodemmicro-organismen inclusief schimmels en 2 litterbag testen. Het dossier bevat dus een ruime hoeveelheid gegevens die betrekking hebben op het decompositieproces.

Studies naar negatieve effecten op decompositie zijn een tijdlang een dossiervereiste geweest voor persistente stoffen (de zgn. litterbag test). Het bleek echter dat deze test te ongevoelig was, en in de nieuwe datavereisten onder 1107 is de test eruit gehaald. De huidige ontwikkeling is dat er meer nadruk gelegd wordt op testen naar effecten op organismen (structuur), en minder op processen. Het idee is dat met voldoende testen en risicobeoordeling op structuurniveau, effecten op processen ook voorkomen zullen worden.

Op grond van het bovenstaande wordt geconcludeerd dat het artikel niet voldoende aanleiding geeft om de bestaande toelatingen met imidacloprid in Nederland te herbeoordelen.

Capowiez en Bérard (2006): In deze studie uit Frankrijk werd onderzocht wat het effect was van imidacloprid (formulering Confidor 200g/L) op het gedrag van regenwormen.
De auteurs verwijzen naar hun eerdere werk waarin ze na blootstelling van wormen aan 0.1 en 5 mg imidacloprid/kg droge grond, significante effecten vonden op:
- ganglengte (afname)
- mate van hergebruik van gangen
- afgelegde afstand in de grond

In deze nieuwe studie hebben de auteurs dit type effecten nader onderzocht. In twee laboratoriumexperimenten werd het gedrag van twee soorten (*Allolobophora icterica* (endogeic) en *Aporrectodea nocturna* (anecic)) onderzocht na blootstelling aan imidacloprid concentraties in grond van 0.5 en 1 mg a.s./kg droge grond. In het ene experiment werden effecten op ganggraaf-gedrag gemeten, in het ander experiment werd gemeten of de wormen blootstelling aan imidacloprid vermeden (avoidance). Gemeten effecten na 6 dagen blootstelling aan imidacloprid (beide testconcentraties) waren als volgt:
- statistisch significante gewichtsafname bij beide soorten
- geen significante vermijding van imidacloprid bij beide soorten
- gewijzigd graafgedrag, i.e. graafdynamiek (afname) en aantal op en neer gaande bewegingen van de wormen (afname)
- gewijzigde 'architectuur' van de gangenstelsels: oppervlakte (afname), diepte (afname), mate van kronkeligheid (toename)
- *A. icterica* stopte bijna volledig met graven (na 24 h) bij beide testconcentraties, terwijl *A. nocturna* continu doorgroef, maar wel significant langzamer
- bij beide soorten lagen de gangenstelsels significant minder diep in de bodem bij beide testconcentraties

De auteurs van het artikel benadrukken dat het belang van regenwormen voor het bodemecosysteem vooral afhangt van hun activiteit (gangen graven en organische stof door de grond mengen), en dat het daarom cruciaal is om subletale effecten van toxische stoffen te onderzoeken die van invloed kunnen zijn op deze activiteit. In de conclusie stellen ze dat de diepte van de gangenstelsels gemakkelijk te meten is, belangrijk is voor watertransport in de bodem, en daarom een bruikbaar eindpunt voor ecologische risicobeoordeling, mits gevalideerd voor een groot aantal stoffen en concentraties.

Vallen deze effecten binnen het toetsingskader? Het data requirement voor regenwormen in 283/2013, punt 8.4.1 'Earthworm – sublethal effects', luidt als volgt: 'A test shall provide information on the effects on growth, reproduction and behaviour of the earthworm.'

Uitgaande van deze tekst vallen de effecten uit de studie van Capowiez and Berard onder het toetsingskader, in ieder geval geldt dit eenduidig voor de groeieffecten. Bij de data requirements hoort verder ook een zgn. 'notice' waarin is vastgelegd welke testrichtlijnen gebruikt moeten worden voor de data requirements. Voor regenwormen is dat OECD test 222, waarin met betrekking tot de effecten als volgt staat beschreven: '*a description of obvious or pathological symptoms or distinct changes in*

behaviour'. Bovengenoemde effecten op ganggraafgedrag zouden hieronder kunnen vallen, in ieder geval wanneer de wormen volledig stoppen met graven.

Het beschermdoel voor regenwormen ligt echter op populatieniveau. Het is niet duidelijk wat voor negatieve gevolgen deze 'ganggraafeffecten' op de regenwormpopulatie kunnnen hebben. Er zal wel effect zijn op de ecosysteemdienst bodem, maar dat is op dit moment nog geen beschermdoel in het toetsingskader voor Ctgb. Voor de op dit moment in Nederland toegelaten middelen op basis van imidacloprid is de berekende concentratie in de bodem (PECsoil) maximaal 0.174 mg a.s./kg. De laagste testconcentratie uit de studie was 0.5 mg a.s./kg, i.e. een factor 2.9 hoger dan de maximaal berekende bodemconcentratie voor de Nederlandse toelatingen.

Concluderend geeft het artikel niet voldoende aanleiding om de Nederlandse toelatingen op basis van imidacloprid te herzien.

Singh en Singh (2005): De studie is uitgevoerd in India in pindavelden gedurende drie jaar (1997-1999), waar het pindazaad (o.a.) behandeld werd met imidacloprid. Het effect van de imidaclopridbehandeling was een toename in dehydrogenase- en phosphomonoesterase-processen in de bodem, die binnen enkele dagen tot weken weer verdwenen was (i.e. geen verschil met de controle). Deze studie wordt in het EASAC-rapport aangehaald om te beschrijven dat er ook effecten op bodemmicro-organismen zijn gevonden, die mogelijk corresponderen met belangrijke ecosysteemdiensten. Daarbij wordt echter wel aangegeven dat er nog weinig studies zijn die empirische verbanden aantonen tussen effecten op bodemorganismen en afname in ecosysteemdiensten.

Gezien de geringe relevantie van deze studie voor de Nederlandse landbouwsituatie, en gezien de onduidelijke risico's van de in de studie gevonden effecten en het ontbreken van normen om deze te beoordelen, geeft de studie niet voldoende aanleiding tot herbeoordeling van de in Nederland toegelaten middelen op basis van imidacloprid.

Constateringen bodemorganismen:
In het EASAC-rapport worden acute toxiciteitswaarden (mortaliteit) voor regenwormen genoemd die lager zijn dan de officiele EU-waarden. Waar deze verschillen vandaan komen is niet duidelijk, echter de toelating is gebaseerd op ofwel strengere eindpunten, namelijk op basis van effecten op reproductie, of op veldstudies waarmee diepgaandere bestudering van de effecten is uitgevoerd als zg. 'hogere tier' in de risicobeoordeling. De genoemde acute toxiciteitswaarden hebben dus een lage relevantie voor de toelatingsbeoordeling.
Het rapport haalt verder een artikel aan waarin de auteurs concluderen dat imidaclopridbehandeling van esdoorns resulteert in imidaclopridresiduen in blad die het natuurlijke decompositieproces afremmen. Aangezien het artikel geen landbouwsituatie betrof, en aangezien toelatingsdossiers in het algemeen en die van imidacloprid specifiek een ruime hoeveelheid gegevens bevatten die betrekking hebben op het decompositieproces, is de relevantie van het artikel voor de toelatingsbeoordeling laag.

In het rapport worden verder effecten van imidacloprid op gedrag van regenwormen besproken, aan de hand van een studie naar de effecten op graafgedrag van wormen. Het huidige beschermdoel voor regenwormen ligt echter op populatieniveau, inclusief een herstelperiode van een jaar. Het is niet duidelijk wat voor negatieve gevolgen deze 'ganggraafeffecten' op de regenwormpopulatie kunnnen hebben. Er zal wel effect zijn op de ecosysteemdienst bodem, maar dat is op dit moment nog geen beschermdoel in het toetsingskader voor Ctgb. De studie is daarnaast uitgevoerd bij een dosering 3x hoger dan de in Nederland toegelaten concentratie in de bodem. Concluderend geeft het artikel niet voldoende aanleiding om de Nederlandse toelatingen op basis van imidacloprid te herzien.

Voor wat betreft effecten op bodemmicro-organismen wordt in het rapport aangegeven dat er effecten op bodemmicro-organismen zijn gevonden die mogelijk corresponderen met belangrijke ecosysteemdiensten, maar dat er nog weinig studies zijn die empirische verbanden aantonen tussen effecten op bodemorganismen en afname in ecosysteemdiensten.

Springstaarten zijn altijd al een vast data requirement voor persistente stoffen en grond/zaadbehandeling. Onder de nieuwe data requirements (point 8.4.2) is dit verder uitgebreid. Er is nog ruimte om ze pas als tweede tier te vragen, maar de interne werkafspraak van het Ctgb is geworden dat we ze als standaard date requirement gaan vragen. Zie Evaluation manual 1107 (2014), Hfst 7 terrestrial soil organims-EU part.

Aquatische organismen
In onderstaande wordt een reactie gegeven op de genoemde punten van het rapport aangaande de aquatische organismen.

Er worden diverse getallen genoemd die iets zeggen over de toxiciteit van imidacloprid voor waterorganismen o.a. het volgende:

- 'experiments in model ecosystems with imidacloprid found that aquatic insects would not survive at levels above 1 ppb (= 1 µg/L)';
  - 'For neonicotinoids, Pisa et al. (2015) performed a species sensitivity distribution of acute toxicity data and predicted a hazardous concentration for 5% of aquatic species for imidacloprid concentrations in water of 1.04 – 2.54 ppb'.

Het Ctgb heeft een herbeoordeling uitgevoerd op grond van nieuwe data uit een artikel van Roessink et al, 2013 en heeft een hazardous concentration for 5% of the aquatic species for imidacloprid berekend van 0,027 ppb. Dit is gebeurd op basis van chronische laboratoriumtesten met een aantal gevoelige insectensoorten, waaronder Ephemeroptera soorten. Deze waarde ligt flink lager dan de bovenstaande waarden genoemd in het EASAC-rapport.

Weliswaar wordt een waarde van 0,01 ppb genoemd in een studie van Van Dijk et al., 2013, als een concentratie waarbij ook sprake zou zijn van significante reducties van macro-invertebraten in oppervlaktewateren. Deze studie is ook meegenomen in de herbeoordeling van imidacloprid inzake de effecten op aquatische ecosystemen. Toen is het volgende geconcludeerd m.b.t. deze studie:
The study of Van Dijk et al. (2013) has been evaluated by Ctgb and the conclusion was that this study cannot be used to show a causal relationship between the concentration of imidacloprid and the number of observed species. This is mainly due to the way the research in this study was done; the imidacloprid concentrations and the biological observations were not from the same locations and time points. A radius of at maximum 1 km has been used between the locations where imidacloprid has been measured and the locations where biological observations (fauna) has been made. Furthermore there was a difference in time of at maximum 160 days between the measurements of concentrations and biological observations. These uncertainties make it very difficult to conclude something from the study.

Het Ctgb heeft vastgesteld dat geen conclusies kunnen worden getrokken op basis van deze studie en derhalve kan deze zinsnede uit het EASAC-rapport sterk in twijfel worden getrokken.

Verder wordt, op basis van studies van Beketov and Liess, 2008 en Liess and Beketov, 2011, een waarde van 0.1 ppb gerapporteerd inzake thiacloprid, waarbij chronische effecten werden gevonden op gevoelige, langlevende insecten. Middelen op basis van thiacloprid dienen nog herbeoordeeld te worden (expiratiedatum: 30-04-2017) voor wat betreft o.a. aquatische ecosystemen en dit gegeven tesamen met de bevindingen inzake imidacloprid en andere neonicotinoiden zou een aanleiding kunnen zijn om deze herbeoordeling versneld uit te voeren. Op dit moment ligt de norm voor aquatische organismen op 1.57 ug as/L op basis van een mesocosm studie.
Uit studies van Alterra blijkt dat thiacloprid mogelijk nog toxischer is dan imidacloprid voor Ephemeroptera (*Cloeon dipterum*), de gevoeligste geteste groep. Dit is wel gedaan met de winterpopulatie van *Cloeon dipterum* en de winterpopulatie is minder gevoelig dan de zomerpopulatie, blijkt uit studies met imidacloprid.
Alterra is van plan om komende zomer de zomerpopulatie van Cloeon dipterum te testen met thiacloprid. Alvorens kan worden vastgesteld of de Nederlandse toelatingen van thiacloprid heroverwogen dienen te worden, zal de publicatie van deze studie moeten worden afgewacht om een volledig beeld van de toxiciteit van thiacloprid voor waterorganismen te verkrijgen.

Constateringen aquatische organismen:
Herbeoordeling op aquatisch vlak is op dit moment niet nodig maar het advies is om eerst de studie met de zomerpopulatie voor thiacloprid (met gevoelige lang levende insecten (waaronder eendagsvliegen)) af te wachten en daarna te bezien of maatregelen noodzakelijk worden geacht.

Overige organismen
Het EASAC-rapport gaat kort in op mogelijke risico's voor vogels, vooral via het eten van behandeld zaad. Zij gebruiken daarbij een artikel dat de Noord-Amerikaanse risicobeoordelingsmethodiek bekritiseert. In Europa is deze methodiek anders en meer in overstemming met de aanbevelingen van het EASAC-rapport, met name op het gebied van verschil in gevoeligheid tussen soorten. Voor zover bekend bij Ctgb zijn in Nederland nooit dode vogels gemeld die waren gestorven door het eten van behandeld zaad. De Europese risicobeoordeling voor zaadbehandeling is uiterst zorgvuldig. Onderwerking en voorkoming van morsen van zaad is zeer belangrijk en wordt gehandhaafd.
Ook noemen de auteurs een publicatie over een correlatie tussen afnemende populatietrends van vogels en gehaltes imidacloprid in het oppervlaktewater in Nederland en wijzen zij op de mogelijke indirecte effecten van bestrijdingsmiddelen op vertebraten via het wegvallen van voedsel. Het Ctgb heeft naar aanleiding van de onderliggende publicatie (Hallmann et al. 2014) de Staatssecretaris in oktober 2014 geïnformeerd over deze mogelijke effecten. Hierin kwam naar voren dat, op basis van de aangehaalde publicatie, geen causaal verband kon worden aangetoond tussen de populatietrends van vogels en gehaltes imidacloprid in het oppervlaktewater. Ook heeft Ctgb gezegd: "Het is de vraag welke indirecte effecten al bij middeltoelating zouden kunnen worden meegenomen en welke effecten middels een gebiedsgerichte aanpak moeten worden beheerst. U wordt geadviseerd de Europese Commissie te verzoeken dit te agenderen in de relevante EU werkgroepen."

Mineau & Palmer 2013
De referentie Mineau en Palmer (2013) gaat in op de risico's van zaadbehandeling. Zij bespreken de risicobeoordeling zoals die in de VS wordt uitgevoerd. In Europa gebruiken we grotere veiligheidsfactoren en is het toetsingskader daarom beter in lijn met wat Mineau en Palmer voorstellen. Hoewel de gehaltes per zaadje soms dicht bij de (met een veiligheidsfactor voor verschil in gevoeligheid tussen soorten gecorrigeerde) letale dosis liggen, zijn in Nederland nooit dode vogels gemeld die waren gestorven door het eten van behandeld zaad. De risicobeoordeling voor zaadbehandeling is uiterst zorgvuldig en bevat meestal verschillende onderdelen. Onderwerking en voorkoming van morsen is zeer belangrijk en wordt gehandhaafd.

Gibbons et al. 2015
Review van 150 studies naar directe en indirecte effecten op wilde vertebraten (zoogdieren, vogels, vissen, amfibieën en reptielen) van neonicotinoïden. Vanwege de sterkere binding van neonicotinoïden aan de nicotine acetylcholine receptoren in insecten in vergelijking met vertebraten, treedt toxiciteit bij vertebraten op bij veel hogere doseringen dan bij insecten en andere invertebraten. De auteurs deden een systematisch literatuuronderzoek. Het overgrote deel van de studies die zij vonden was uitgevoerd in het laboratorium, betrof directe toxische effecten, is gedaan met de stoffen imidacloprid, clothianidin of fipronil en uitgevoerd met zoogdieren, vogels of vissen.
De auteurs behandelen de volgende punten, waarop Ctgb reageert:
-*Er is te weinig aandacht voor verschil in gevoeligheid tussen soorten in de Noord-Amerikaanse risicobeoordeling*: in de Europese methodiek wordt hier veel meer rekening gehouden.
-*Reproductiestudies met vogels onderzoeken effecten op broed- en kuikenzorg niet en kunnen lage power hebben om effecten aan te tonen, maar zijn dan wel weer worst case in blootstellingsduur*: Zoals de auteurs zelf ook zeggen is dit de enige test die beschikbaar is om reproductie-effecten te onderzoeken. Gezien de continue blootstelling gedurende maanden verwacht Ctgb dat deze test inderdaad worst case eindpunten zal opleveren.
-*Subletale effecten kunnen optreden ver (tot 1000x lager) onder de letale dosis maar worden niet meegenomen in de acute risicobeoordeling*. Dit is correct, maar in de chronische risicobeoordeling, die ook altijd wordt uitgevoerd, worden subletale effecten wel meegenomen.
- *Veldconcentraties in water zitten ver onder de letale niveau's voor imidacloprid en clothianidin, wel dichter bij die van fipronil; subletale effecten zijn soms wel te verwachten op vissen*. Echter, het risico voor invertebraten is beduidend groter dan voor vertebraten. Derhalve wordt het risico voor vertebraten gedekt door de risicobeoordeling voor invertebraten.
- *Behandelde zaden bevatten een dosis die dicht bij de letale dosis ligt*. Dit klopt voor veel van de zaadbehandelingen, daar wordt in de risicobeoordeling rekening mee gehouden en er zijn vaak uitgebreide verfijningen nodig. Merk op dat hierbij met een veiligheidsfactor rekening wordt gehouden met het mogelijke verschil in gevoeligheid tussen soorten. Er zijn in Nederland nooit incidenten gemeld met dode vertebraten door het eten van behandeld zaad.
- *Indirecte effecten (het wegnemen van voedsel door bestrijden van insecten en planten) worden niet meegenomen maar zijn potentieel belangrijk*. Indirecte effecten maken momenteel inderdaad geen onderdeel van het toetsingskader ook niet in nieuwe aquatische guidance document. Hier heeft Ctgb in

september 2014 per brief aan de staatssecretaris op gereageerd: "Het is de vraag welke indirecte effecten al bij middeltoelating zouden kunnen worden meegenomen en wellke effecten middels een gebiedsgerichte aanpak moeten worden beheerst. U wordt geadviseerd de Europese Commissie te verzoeken dit te agenderen in de relevante EU werkgroepen."

Hallman et al. 2014
Hier heeft Ctgb in september 2014 per brief aan de staatssecretaris op gereageerd: "Het Ctgb is alert op signalen uit de wetenschappelijke literatuur over effecten van gewasbeschermingsmiddelen. Het Nature-artikel is één van die signalen. In de afgelopen jaren zijn maatregelen genomen om de effecten van imidacloprid op de bijenstand en op het waterleven binnen aanvaardbare normen te houden. Het effect van deze maatregelen zal de komende tijd zichtbaar (moeten) worden in verlaging van de gehaltes imidacloprid in oppervlaktewater. Het Ctgb is van mening dat de uitwerking van deze maatregelen moet worden afgewacht alvorens eventuele nieuwe maatregelen aan de orde kunnen zijn."

Lopez-Antia et al. 2013
Patrijzen (*Alectoris rufa)*, per paar in een buitenkooitje, werden 25 of 10 dagen lang gevoerd met graan, waarbij het graan behandeld was met 0, 0,14 of 0,7 mg imidacloprid/g zaad (dit stemt volgens het artikel overeen met 0%, 20% en 100% van de toegelaten dosering in Spanje). Bij de hoge dosering stierven alle dieren binnen 21 dagen, de vrouwtjes eerder dan de mannetjes. Bij de lage dosering werden effecten gevonden op een aantal biochemische parameters en kleur van de snavel en oogring, was er een lager aantal eieren per nest, was de eerste eilegdatum uitgesteld, waren er effecten op het gehalte vitamininen en carotenoiden in de dooier, en was een bepaalde immuunreactie in de kuikens verlaagd. Tijdens de blootstellingsperiode werd imidacloprid aangetroffen in de lever en krop van de behandelde vogels.
De gevonden sterfte is hoger dan in een eerdere studie van dezelfde auteurs, wat geweten wordt aan de lagere temperatuur tijdens de huidige studie waardoor vogels meer of sneller aten.
De auteurs concluderen dat vermijding van zaad hier niet zo'n grote rol speelde dat het sterfte kon voorkomen. Zij wijzen op de risico's voor vogels via het eten van behandeld zaad.

In de toelatingsbeoordeling wordt rekening gehouden met deze risico's. Als een theoretisch dieet, volledig bestaand uit behandeld zaad, leidt tot potentiële risico's, kan volgens de EFSA guidance voor vogels en zoogdieren gekeken worden naar meer realistische situaties, met bijvoorbeeld met gemengde dieten en onderwerking van zaden. In Nederland zijn geen toelatingen afgegeven voor imidacloprid als zaadbehandeling van granen, maar gebruik is Nederland is theoretisch wel mogelijk gezien het vrije verkeer van zaad binnen de EU indien er een toelating is in één van de lidstaten. Hierbij wordt erop vertrouwd dat deze andere lidstaat de risicobeoordeling juist heeft uitgevoerd en de restrictiezinnen heeft voorgeschreven die nodig zijn voor een veilig gebruik. In Nederland zijn Ctgb geen incidenten bekend van vogels die gestorven zijn door het eten van behandeld zaad.

Bijlage II - Overzicht van toegelaten neonicotinoïde-houdende gewasbeschermingsmiddelen In Nederland

Onderstaand is een overzicht opgenomen van alle Nederlandse toegelaten neonicotinoïde-houdende gewasbeschermingsmiddelen. Hierbij dient in ogenschouw te worden genomen dat voor alle toelatingen relevante risicoreducerende maatregelen zijn opgelegd. Het gaat hierbij onder andere om:

- Niet gebruiken van het middel op bloeiende gewassen ter bescherming van bijen en bestuivende insecten.
- Geen bij-aantrekkelijke gewassen zaaien of planten in de periode na uitplanten om bijen en bestuivende insecten te beschermen.
- Verplichte zuivering bij lozing van drainwater op oppervlaktewater om in het water levende organismen te beschermen.
- Direct onderwerken of beregenen na uitzaaien om vogels en zoogdieren te beschermen.
- Driftreducerende maatregelen, zoals het gebruik van specifieke spuitdoppen en deflectoren om in het water levende organismen te beschermen.

In het EASAC-rapport wordt daarnaast ingegaan op het curatief danwel preventief toepassen van gewasbeschermingsmiddelen. Daar waar zaadbehandeling een preventieve toepassing betreft, kan een spuittoepassing zowel preventief als curatief worden toegepast. Het Ctgb beoordeelt de risico's van het gebruik van een gewasbeschermingsmiddel en maakt in zoverre geen onderscheid in preventieve of curatieve toepassing.

Imidacloprid

Middel	Toepassing	Teelt
Merit Turf	- Professioneel - Onbedekte teelt - Spuittoepassing	Toegestaan is uitsluitend het gebruik als insectenbestrijdingsmiddel op sportvelden, inclusief golfterrein (tees, greens en/of fairways) en graszodenteelt. Op golfterreinen mag het middel niet buiten de tees, greens en fairways worden toegepast.
Sombrero	- Professioneel - Onbedekte teelt - Zaadbehandeling	Toegestaan is uitsluitend het gebruik als insectenbestrijdingsmiddel, toegepast door middel van een zaadbehandeling in de teelt van suikerbieten en voederbieten.
Potatoprid	- Professioneel - Onbedekte teelt - Grondbehandeling	Toegestaan is uitsluitend het gebruik als insectenbestrijdingsmiddel in de teelt van pootaardappelen, toegepast door middel van een grondbehandeling bij het poten.
Admire	- Professioneel - Zowel in de bedekte als onbedekte teelt - Spuittoepassing	Toegestaan is uitsluitend het professionele gebruik als insectenbestrijdingsmiddel hop, appel, peer, vruchtgroenten, bloembol-en bloemknolgewassen (muv...),eerstejaars plantgoed van bijgoed van overige bloembollen en bloemknollen, dat in het najaar geplant wordt (onbedekte teelt), bloemisterijgewassen, boomkwekerijgewassen, vaste plantenteelt.
Wopro Imidacloprid (parallele toelating van Admire)	- Professioneel - Zowel in de bedekte als onbedekte teelt - Spuittoepassing	Toegestaan is uitsluitend het professionele gebruik als insectenbestrijdingsmiddel hop, appel, peer, vruchtgroenten, bloembol-en bloemknolgewassen (muv...),eerstejaars plantgoed van bijgoed van overige bloembollen en bloemknollen, dat in het najaar geplant wordt (onbedekte teelt), bloemisterijgewassen, boomkwekerijgewassen, vaste plantenteelt.
Gaucho Tuinbouw	- Professioneel - Bedekte teelt ten behoeve van de onbedekte teelt - Zaadbehandeling	Toegestaan is uitsluitend het professionele gebruik als insectenbestrijdingsmiddel door middel van een zaadbehandeling (inclusief dummy pill of Phyto-drip) in sla, andijvie, sluitkoolachtige, bloemkoolachtige, bladkoolachtige
Kohinor 700 WG	- Professioneel - Zowel in de bedekte als onbedekte teelt - Spuittoepassing	- in de teelt van appels en peren door middel van een gewasbehandeling met een maximum aantal behandelingen van één keer per seizoen, met dien verstande dat toepassing alleen is toegestaan na de bloei van appel en peer; - in de bedekte teelt van aubergine, courgette, komkommer, tomaat, Spaanse peper en paprika, met dien verstande dat het middel slechts

		centraal met de voedingsoplossing c.q. door middel van directe kraanvak-injectie mag worden meegegeven, met dien verstande dat het middel op de dag van de oogst niet vóór de oogst mag worden toegepast. - bij de opkweek van plantmateriaal (bedekte teelt) van aubergine, courgette, komkommer, tomaat, Spaanse peper en paprika door middel van een gewasbehandeling; - in de bedekte teelt van bloemisterijgewassen door middel van een gewasbehandeling en een druppelbehandeling. - in de bedekte teelt van bloembol-, knol-, knolbloem- en bolbloemgewassen door middel van een gewasbehandeling. - ten behoeve van de onbedekte teelt van: - bloembollen van lelie (vermeerderingsteelt), - plantgoed van gladiool, - eerstejaars plantgoed van bijgoed van overige bloembollen en bloemknollen - door middel van een dompelbehandeling, met dien verstande dat er geen bloei op het veld optreedt en dat er binnen 16 maanden na planten geen voor bijen aantrekkelijke gewassen geplant of gezaaid worden. In amaryllis, dahlia, hyacint, narcis, tulp, iris en krokus is toepassing niet toegestaan. - ten behoeve van de bedekte teelt van bloembol-, knol-, knolbloem- en bolbloemgewassen met uitzondering van grofbollige narcissen en lelie, door middel van een dompelbehandeling; - in de bedekte teelt van boomkwekerijgewassen en vaste planten door middel van een gewasbehandeling;

Acetamiprid

Middel	Toepassing	Teelt
Gazelle	- Professioneel - Zowel bedekt als onbedekt - Spuittoepassing	a. in de teelt van consumptie-, zetmeel- en pootaardappelen, vanaf het moment dat het gewas 50% grondbedekking heeft; b. in de teelt van appels, peren en kersen; c. in de bedekte teelt van aubergine, tomaat, paprika en Spaanse peper; d. in de bedekte teelt van augurk, courgette, komkommer en andere vruchtgroenten van Cucurbitaceae met eetbare schil; e. in de teelt van bloembol-, bloemknol- en bolbloemgewassen; f. in de teelt van bloemisterijgewassen; g. in de teelt van boomkwekerijgewassen en vaste planten; h. in openbaar groen, met uitzondering van grasvegetaties; i. in de bedekte veredelings- en zaadteelt van akkerbouw-, groente- en bloemisterijgewassen.

Thiacloprid

Middel	Toepassing	Teelt
Calypso Spray	- Niet-professioneel - Zowel bedekt als onbedekt - - Spuittoepassing	Toegestaan is uitsluitend het gebruik als insectenbestrijdingsmiddel op sierplanten in de tuin (in de volle grond) en op kamerplanten (binnenshuis).

Calypso vloeibaar	- Niet-professioneel - Zowel bedekt als onbedekt - Spuittoepassing	I. a. sierplanten in de tuin b. rode-, witte-, zwarte-, blauwe en kruisbes c. loganbes, taybes, braam en framboos d. bloembol-, bloemknol- en bolbloemgewassen e. aardappelen f. appels, peren, pruimen en kersen g. aardbei h. bieten II. Toegestaan is uitsluitend het gebruik als insectenbestrijdingsmiddel als aangietbehandelir
Calypso vloeibaar (afgeleide van bovenstaande calypso vloeibaar)	- Niet-professioneel - Zowel bedekt als onbedekt - Spuittoepassing	I. Toegestaan is uitsluitend het gebruik als insectenbestrijdingsmiddel door middel van een gewasbehandeling in de vollegrondsteelt van sierplanten in de tuin. II. Toegestaan is uitsluitend het gebruik als insectenbestrijdingsmiddel als aangietbehandeling van kamerplanten
Exemptor	- Professioneel - Zowel bedekt als onbedekt - Spuittoepassing	Toegestaan is uitsluitend het gebruik als insecticide in de pot- en containerteelt van: - Bloemisterijgewassen, - Boomkwekerijgewassen, - Vaste planten,
Sonido	- Professioneel - Onbedekte teelt - Zaadbehandeling	Insectenbestrijdingsmiddel door middel van een zaadbehandeling in mais (wederszijdse erkenning)
Calypso	- Professioneel - Zowel bedekt als onbedekt - Spuittoepassing	I :Gewasbehandeling: a. in de teelt van aardappel b. in de teelt van suikerbiet en voederbiet met dien verstande dat maximaal 2 bespuitingen per seizoen zijn toegestaan c. in de teelt van granen d. in de onbedekte teelt van peulvruchten (inclusief landbouwerwten, landbouwstambonen, veldbonen) met dien verstande dat maximaal 2 bespuitingen per seizoen zijn toegestaan e. in de teelt van koolzaad, blauwmaanzaad, vezelvlas en mosterdzaad f. in de teelt van hennep met dien verstande dat maximaal 2 bespuitingen per seizoen zijn toegestaan g. in de teelt van appels, peren, pruimen en kersen (onbedekt) (zie onderaan voor restricties) h. in de teelt van rode bes, witte bes, zwarte bes, kruisbes en blauwe bes, i. in de bedekte teelt van cranberry, vlierbes, bosbes (inclusief vossebes en veenbes), azarole, duindoorn, meidoorn, jochelbes, jostabes, en peerlijsterbes j. in de teelt van braam en framboos k. in de onbedekte teelt van loganbes en taybes l. in de teelt van aardbei met dien verstande dat maximaal 2 bespuitingen per seizoen zijn toegestaan m. in de bedekte teelt van rozenbottel n. in bedekte teelt van aubergine, augurk, courgette, komkommer, paprika, pattison, Spaanse peper en tomaat o. in onbedekte teelt van sluitkool, spruitkool, bloemkool, broccoli, Chinese kool en Oosterse bladkolen p. in de teelt van koolrabi q. in de teelt van koolraap, knolraap, pastinaak, radijs, rammenas, rettich en daikon r. in de teelt van bos-, was- en winterpeen en Parijse wortel s. in de teelt van schorseneer t. in de teelt van rode biet u. in de teelt van knolselderij en wortelpeterselie v. in de teelt van witlof- en cichoreipennen met dien verstande dat maximaal 2 bespuitingen per seizoen zijn toegestaan w. in de teelt van asperges met dien verstande dat maximaal 2 bespuitingen per seizoen zijn toegestaan x. in de onbedekte teelt van bleekselderij en knolvenkel y. in de onbedekte teelt van bloembol-, bloemknol- en bolbloemgewassen met dien verstande dat maximaal 2 bespuitingen per seizoen zijn toegestaan z. in de bedekte teelt van bloembol-, bloemknol- en bolbloemgewassen met dien verstande dat maximaal 3 bespuitingen per seizoen zijn toegestaan aa. in de bedekte teelt van bloemisterijgewassen bb. in de onbedekte teelt van bloemisterijgewassen met dien verstande dat maximaal 2 bespuitingen per seizoen zijn toegestaan cc. in de teelt van boomkwekerijgewassen i. in spillen met dien verstande dat langs oppervlaktewater maximaal 3 bespuitingen zijn toegestaan ii. in opzetters met dien verstande dat langs oppervlaktewater maximaal 980 liter spuitvloeistof per hectare mag worden verspoten

		iii. in overige boomkwekerijgewassen met dien verstande dat langs oppervlaktewater maximaal 3 bespuitingen met maximaal 1100 liter spuitvloeistof zijn toegestaan dd. in de teelt van vaste planten met dien verstande dat langs oppervlaktewater maximaal 3 bespuitingen zijn toegestaan ee. in particuliere tuinen met dien verstande dat maximaal 2 bespuitingen per seizoen zijn toegestaan ff. in openbaar groen met dien verstande dat maximaal 2 bespuitingen per seizoen zijn toegestaan gg. de veredeling en zaadteelt van overige akkerbouw-, groenten- en bloemisterijgewassen II Aangietbehandeling III Druppelbehandeling, mits toegepast na 1 maart: ii. in de teelt op substraat van aubergine, paprika, Spaanse peper en tomaat.
Calypso (parallelle toelating van de Calypso hierboven)	- Professioneel - Zowel bedekt als onbedekt - Spuittoepassing	Zie hierboven.

Thiamethoxam

Middel	Toepassing	Teelt
Actara	- Professioneel - Zowel bedekt als onbedekt - Spuittoepassing	I. Gewasbehandeling a. in de teelt van consumptie-, zetmeel- en pootaardappelen, met dien verstande dat toepassing alleen is toegestaan na de bloei b. in de bedekte teelt van bloembol-, knol- en bolbloemgewassen c. in de onbedekte teelt van bloemisterijgewassen, met dien verstande dat toepassing alleen is toegestaan na de bloei of op gewassen die op het veld niet tot bloei komen d. in de bedekte teelt van bloemisterijgewassen e. in de onbedekte teelt van boomkwekerijgewassen en vaste planten, met dien verstande dat toepassing alleen is toegestaan na de bloei of op gewassen die op het veld niet tot bloei komen f. in de bedekte teelt van boomkwekerijgewassen en vaste planten II. Grondbehandeling a. ten behoeve van de teelt van consumptie-, zetmeel- en pootaardappelen
Cruiser SB	- Professioneel - Onbedekte teelt - Zaadbehandeling	Zaden van suikerbieten en voederbieten ter voorkoming van schade door insecten.
Cruiser 70 WS	- Professioneel - Zowel bedekt als onbedekt - Zaadbehandeling	Toegestaan is uitsluitend het gebruik als zaadbehandelingsmiddel ter voorkoming van schade door insecten voor de behandeling van zaden van: a. sla (met uitzondering van veldsla) en andijvie, met dien verstande dat er binnen een periode van een jaar (365 dagen) gerekend vanaf het uitplanten op het veld geen voor bijen aantrekkelijke gewassen worden gezaaid of geplant b. sluitkool, spruitkool, bloemkool, broccoli, boerenkool en Chinese kool, met dien verstande dat er voor Chinese kool binnen een periode van 7 maanden en voor boerenkool binnen een periode van 5 maanden gerekend vanaf het uitplanten op het veld geen voor bijen aantrekkelijke gewassen worden gezaaid of geplant

Clothianidine

Middel	Toepassing	Teelt
Poncho Beta	- Professioneel - Onbedekte teelt - Zaadbehandeling	Toegestaan is uitsluitend het gebruik als middel voor behandeling van zaden van suikerbieten en voederbieten ter voorkomen van schade door insecten.